

Induktion neutralisierender Antikörper gegen transmembrane Hüllproteine von Retroviren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom Biochemiker Uwe Fiebig

geboren am 21.03.1971 in Potsdam

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutacher/innen: 1. Prof. Dr. D.H. Krüger

2. Prof. Dr. R. Kurth

3. Prof. Dr. H. Zeichhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2008

Danksagung

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Robert Koch-Institut und die stetige Diskussionsbereitschaft möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Reinhard Kurth und bei Dr. Joachim Denner (BMG Ressortforschung 328-13500/03) bedanken.

Für die externe Betreuung der Arbeit danke ich Prof. Dr. Detlev Krüger vom Institut für Virologie der Humboldt-Universität Berlin.

Bei allen Mitarbeitern Arbeitsgruppe P23 bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die technische Assistenz. Mein besonderer Dank gilt Mirco Schmolke und Alexander Karlas für die gute Zusammenarbeit und die zahlreichen Denkanstöße in fachlichen Diskussionen.

Für die Durchführung der *Capture*-ELISA danke ich Dr. Stephen und Nicky Norley. Darüber hinaus danke ich Dr. Stephen Norley für seine stetige Diskussionsbereitschaft.

Für die Unterstützung bei den Rattenversuchen danke ich Annette Dietrich und dem gesamten Team des Tierstalls im Robert Koch-Institut.

Für die Unterstützung bei den Ziegenversuchen danke ich dem Team von Dr. Wolf vom Institut für Risikobewertung in Berlin-Marienfelde.

Dr. Heinz Ellerbrock und Dr. Claudia Kücherer gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Etablierung der *Realtime*-PCR.

Meinen Eltern danke ich für die moralische und finanzielle Unterstützung während des gesamten Studium und der Doktorandenzeit.

Meiner Freundin Nadine gilt mein besonderer Dank für die Geduld und das Verständnis, das sie mir während der Anfertigung dieser Arbeit klaglos entgegenbrachte

.

Folgende Reagenzien wurden durch das NIH AIDS Research and Reference Reagent Program zu Verfügung gestellt:

- HIV-1 gp41 monoklonaler Antikörper (2F5) von Dr. Herman Katinger
- C8166 von Dr. Robert Gallo
- HIV-1 MN Env und HIV-1HXB2 GAG Peptidset

Zusammenfassung

Die Transplantation von porzinen Organen könnte eine Lösung des akuten Mangels von Allotransplantaten in der Transplantationsmedizin darstellen. Bevor die Xenotransplantation klinische Realität werden kann, sind jedoch zahlreiche Hürden zu überwinden. Insbesondere die mögliche Übertragung porziner endogener Retroviren (PERVs), die integraler Bestandteil des porzinen Genoms sind, stellt ein mikrobiologisches Risiko dar. PERVs können humane Zellen in vitro produktiv infizieren. Mögliche Strategien zur Abwehr von Xenosen sind die Verwendung von PERV-knockout Tieren oder die Entwicklung eines effektiven Impfstoffes, durch den der Transplantatrezipient vor einer möglichen Übertragung geschützt werden kann. Dazu wurden Antiseren gegen die Hauptstrukturproteine von PERV generiert. Es konnte gezeigt werden, dass in Ziegen und Ratten durch Immunisierung mit der rekombinant generierten Ektodomäne des transmembranen Hüllprotein p15E neutralisierende Antikörper induziert werden konnten. Die Epitopkartierung der induzierten Antikörper zeigt eine Bindung an eine Domäne im N-terminalen, nahe des Fusionspeptids (E1, GPQQLEK) und eine Domäne im C-terminalen, membranproximalen (E2, FEGWFN) Bereich der p15E-Ektodomäne. Diese Sequenzen sind in allen PERVs identisch und innerhalb der Gammaretroviren hochkonserviert.

Aus AIDS-Patienten isolierte neutralisierende Antikörper (mAb2F5: ELDKWA, mAb4E10: LWNWFN) binden ebenfalls an den C-terminalen Bereich der Ektodomäne des Transmembranproteins gp41. Der Bindungsmechanismus dieser Antikörper wurde in ELISA-Experimenten und in vitro-Inhibitionsassays analysiert. Die Ergebnisse legen die Bindung eines Konformationsepitopes nahe, das aus der E1 und der E2 Domäne gebildet wird. Die Aufklärung des Bindungsmechanismus breit neutralisierender Antikörper gegen Transmembranproteine von Retroviren könnte die Basis für neue Impfstoffansätze darstellen.

Schlagwörter:

PERV, HIV, neutralisierende Antikörper, Impfstoffentwicklung

Abstract

Porcine xenotransplants may offer a potential solution to the problem posed by the limited supply of allotransplants. However, xenotransplantation may be associated with the risk of transmission of microorganisms, in particular of porcine endogenous retroviruses (PERVs) that are an integral part of the porcine genome and able to infect human cells *in vitro*. Possible strategies to prevent virus transmission include the development of PERV knockout animals or of effective vaccines. When antisera prepared against the main structural proteins of PERV were screened, goat and rat antisera against the recombinant ectodomain of the transmembrane envelope protein p15E were found to neutralize PERV infectivity. Epitope mapping using overlapping peptides revealed two epitopes, one near the fusion peptide (E1, GPQQLEK) and the other near the transmembrane domain (E2, FEGWFN). These sequences are identical for all PERVs and are highly conserved among all gammaretroviruses.

Interestingly, neutralizing antibodies isolated from AIDS patients that recognize regions partially homologous with E2 (mAb4E10, LWNWFN) or located in close proximity to E2 (mAb2F5, ELDKWA) are known to neutralize a broad range of HIV-1 strains. The binding mechanisms of these HIV neutralizing antibodies were analyzed in ELISA experiments and *in vitro* inhibition assays. The results indicate that the two most broadly reactive HIV-1 envelope gp41 human mAbs are specific for a discontinuous epitope composed of the E1 and the E2 domain. If so, these two transmembrane protein domains in different retroviruses act as effective targets for neutralizing antibodies and may provide the basis for effective antiretroviral vaccines.

Keywords:

PERV, HIV, neutralizing antibodies, vaccine development

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	ii	
Zusammenfassung	iii	
Abstract	iv	
Inhaltsverzeichnis	v	
Verzeichnis der Tabellen	x	
Verzeichnis der Abbildungen	xi	
Abkürzungsverzeichnis	xiv	
I	Einleitung	1
I.1	Retroviren	2
I.1.1	Einteilung der Retroviren	3
I.1.2	Genomstruktur der Retroviren	4
I.1.3	Morphologie und Virusproteine der Retroviren	5
I.1.4	Replikation	10
I.1.5	Gammaretroviren	13
I.1.6	Lentiviren	20
I.1.7	Pathogenes Potential von Retroviren	25
I.2	Zielsetzung der Arbeit	26
II	Material und Methoden	28
II.1	Materialien und Bezugsquellen	28
II.2	Sterilisation von Materialien	28
II.3	Verwendete Antikörper	28
II.4	Peptide	29
II.5	Primer und Sonden	29
II.6	Bakterienstämme und Expressionsplasmide	31

II.7	Kultivierung von <i>E. coli</i>	31
II.8	Verwendete Nährmedien	32
II.9	Transformation von Bakterien	32
II.10	Vorkulturen	33
II.11	Glycerindauerkulturen	33
II.12	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	33
II.12.1	IPTG-induzierte Expression	33
II.12.2	Aufschluss der Bakterien	34
II.12.3	Aufreinigung rekombinanter Proteine	34
II.13	Molekularbiologische Methoden	35
II.13.1	Plasmid-Präparation aus <i>Escherichia coli</i>	35
II.13.2	Reinigung von DNA-Fragmenten	35
II.13.3	Isolierung genomischer DNA	36
II.13.4	Agarosegel-Elektrophorese	36
II.13.5	Restriktionsverdau	36
II.13.6	Ligation von DNA-Fragmenten	37
II.13.7	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	38
II.13.8	Kolonie-PCR	38
II.13.9	<i>Realtime</i> -PCR	39
II.13.10	Sequenzierung	40
II.14	Biochemische und immunologische Methoden	40
II.14.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	40
II.14.2	Trennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
II.14.3	Isolierung PERV-p15E-spezifischer Antikörper durch Affinitätschromatographie	42

II.14.4	IgG-Isolierung durch ProteinG-Chromatographie	43
II.14.5	Epitopkartierung	43
II.14.6	Western Blot Analyse	43
II.14.7	ELISA	44
II.14.8	Immunfluoreszenzmikroskopie	45
II.14.9	Durchfluss-Zytometrie	46
II.14.10	Kopplung von synthetischen Peptiden an Trägermoleküle	47
II.14.11	Herstellung von Acetonpuder aus Bakterienlysat	48
II.14.12	Dichtegradientenzentrifugation	48
II.14.13	Quantifizierung der reversen Transkriptase	49
II.15	Durchführung der Tierversuche	50
II.15.1	Versuchstiere	50
II.15.2	Applikation des Antigens	50
II.15.3	Blutabnahme und Serumgewinnung	50
II.16	Virologische und zellbiologische Methoden	51
II.16.1	Verwendete Zellen, Medien und Viren	51
II.16.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	52
II.16.3	Anlegen von Virusstocks	52
II.16.4	Neutralisationsassay PERV	53
II.16.5	Neutralisationsassay HIV	54
III	Ergebnisse	55
III.1	Induktion PERV-neutralisierender Antikörper	55
III.1.1	Generierung und Charakterisierung von Ziegenseren gegen rekombinantes p15E	56
III.1.2	Nachweis PERV-neutralisierender Aktivität in den generierten Seren	61

III.1.3	Untersuchung der Reaktivität des Ziegenserums 20 gegen synthetische Peptide	62
III.1.4	Hemmung der neutralisierenden Aktivität durch rp15E und synthetische Peptide	65
III.1.5	Einfluss der Vorinkubation auf die Virusneutralisation	67
III.1.6	Immunisierung von Ratten mit rekombinanten p15E	69
III.1.7	Immunisierung von Ratten mit PERV-E1 und -E2 abgeleiteten Peptiden	72
III.1.8	Test auf Kreuzneutralisation	73
III.2	Entwicklung eines Realtime-PCR-Assays zum Nachweis der PERV-Provirusintegration	74
III.3	Induktion HIV-neutralisierender Antikörper	75
III.3.1	Immunisierung von Ratten mit rekombinanten gp41	75
III.3.2	Neutralisationstest und Epitopkartierung	79
III.4	Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers 2F5	81
III.4.1	Epitopkartierung von mAb 2F5	81
III.4.2	Identifizierung von Sequenzen die mit dem 2F5-Epitop interagieren	83
III.4.3	Einfluss verschiedener stöchiometrischer Verhältnisse der Peptide 6342 und 6373 auf die Bindung von 2F5	85
III.4.4	Einfluss von Aminosäuresubstitutionen im Peptid NIH-6342	86
III.4.5	Hemmung der neutralisierenden Aktivität von 2F5 durch synthetische Peptide	88
III.5	Induktion HIV-E1/E2-spezifischer Antikörper	89
III.5.1	Immunisierung mit gekoppelten und freien Peptiden	90
III.5.2	Nachweis der Spezifität der HIV-neutralisierenden Seren	93
III.5.3	Reproduktion der Ergebnisse und statistische Absicherung	96

III.6	Zusammenfassung: Induktion bindender und neutralisierender Antikörper gegen PERV und HIV	97
IV	Diskussion	99
IV.1	Induktion einer protektiven Immunantwort	99
IV.2	Entwicklung eines PERV-Impfstoffs	104
IV.3	Entwicklung eines HIV-Impfstoffs	114
IV.4	Ausblick	123
V	Zusammenfassung	125
	Literaturverzeichnis	127
	Eigene Publikationen	138
	Eidesstattliche Erklärung von Uwe Fiebig	141

Verzeichnis der Tabellen

Tab. I.1: Einteilung der Retroviren und charakteristische Vertreter (nach Modrow, 2003)	4
Tab. I.2: Vergleich der potentiellen Spendertiere für die Xenotransplantation	14
Tab. I.3: In Deutschland zugelassene FeLV-Impfstoffe (Quelle: Paul-Ehrlich-Institut, 09/2003)	19
Tab. I.4: HIV-Therapeutika in klinischer Anwendung.	23
Tab. I.5: Neutralisierende monoklonale Antikörper gegen HIV-1 Hüllproteine	24
Tab. III.1: Neutralisationstiter der PERV-spezifischen Seren:	70
Tab. III.2: Immunisierung von Wistar-Ratten mit von den identifizierten Epitopen (PERV-E1 u. PERV-E2) abgeleiteten synthetischen Peptiden.	72
Tab. III.3: Test PERV-A neutralisierender Seren auf Kreuzreaktivität gegen den PERV-Subtyp B, FeLV-A, Mo-MuLV und HIV-1 IIIB.	73
Tab. III.4: Ermittlung der Bindungsstärke von 2F5 an Einzelpetide und an die Kombination der Peptide mit dem das ELDKWA-Epitop enthaltenden Peptid 6373 im ELISA.	85
Tab. III.5: Gegenüberstellung der experimentellen Daten der Untersuchungen zu PERV- bzw. HIV-neutralisierender Antikörper:	97
Tab. IV.1: Sequenzhomologie der Epitope E1 und E2 in verschiedenen Retroviren.	110

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. I.1: Schematische Darstellung der retroviralen Genomorganisation der in das Zellgenom integrierten Provirus-DNA:	5
Abb. I.2: Schematische Darstellung eines Lentivirus (HIV-1). (http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/STRUCTURE/INDEX.HTML)	6
Abb. I.3: Strukturmodell der HIV-1 Oberflächenproteins gp120	7
Abb. I.4: Strukturmodell des Transmembranhüllproteins gp41 von HIV-1	8
Abb. I.5: Schematische Darstellung der Konformationsänderungen des HIV-Glykoprotein-Komplexes während Membranfusion (Liu et al, 2003).	11
Abb. I.6: Replikationszyklus von HIV-1:	12
Abb. I.7: Globale Ausbreitung der HIV-1 Epidimie:	21
Abb. III.1: Versuchsstrategie zur Induktion neutralisierender Antikörper gegen das porzine endogene Retrovirus (PERV) und das humane Immundefizienzvirus (HIV-1).	55
Abb. III.2: Schematische Darstellung des zur Immunisierung eingesetzten rekombinanten rp15E.	56
Abb. III.3: Immunchemische Analyse der induzierten PERV-p15E-spezifischen Ziegenserum 16 und 20 gegen virales und rekombinantes p15E	57
Abb. III.4: Reaktivität der generierten Seren gegen PERV-5°-infizierte 293-Zellen in der Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	59
Abb. III.5: Kartierung der Antikörperbindungsstellen innerhalb der Ektodomäne von p15E mittels PepSpot-Membran.	60
Abb. III.6: <i>In vitro</i> Neutralisationsassay zur Bestimmung PERV-neutralisierender Aktivität der generierten Seren.	61
Abb. III.7: : Bindung p15E-spezifischer Antikörper aus dem Ziegenserum 20 an die synthetischen Peptide PERV-E1 und -E2 im ELISA.	63
Abb. III.8: Affinitätschromatographische Trennung E1- und E2-spezifischer Antikörper.	64

Abb. III.9: Hemmung der PERV-neutralisierenden Aktivität des Ziegenserums 20 durch rp15E und die synthetischen Peptide E1 und E2 im <i>in vitro</i> -Neutralisationsassay.	66
Abb. III.10: Einfluss der Vorinkubation der PERV-Überstände mit Präimmun- und Immunserum der Ziege 20.	68
Abb. III.11: Nachweis p15-spezifischer Antikörper im ELISA	70
Abb. III.12: Epitopkartierung PERV-neutralisierender Seren (Ziegenserum 16 und 20, Wistar-Ratten Gruppe A-C).	71
Abb. III.13: Entwicklung eines Realtime-PCR-Assays zum quantitativen Nachweis der PERV-Provirusintegration.	74
Abb. III.14: Schematischer Aufbau des zur Immunisierung verwendeten rekombinanten gp41.	76
Abb. III.15: Generierung der rekombinanten Ektodomäne von gp41 als CBP-Fusionsprotein. A: SDS-PAGE/Coomassie-färbung.	76
Abb. III.16: Nachweis gp41-bindender Antikörper in den generierten Seren durch ELISA.	78
Abb. III.17: Epitopkartierung der generierten HIV-1-gp41 spezifischen Immunseren.	80
Abb. III.18: Vergleich der Bindung von 2F5 an DP178 und die gp41-Ektodomäne	82
Abb. III.19: Epitopkartierung des monoklonalen Antikörpers 2F5 unter Verwendung einer PepSpot-Membran.	83
Abb. III.20: Bindung des monoklonalen Antikörpers 2F5 an von der gp41-Ektodomäne abgeleitete Peptide unter verschiedenen Harnstoffkonzentrationen.	84
Abb. III.21: Einfluss verschiedener stöchiometrischer Verhältnisse des Peptids P6342 zum Peptid P6373 auf die Bindung von 2F5.	86
Abb. III.22: Einfluss von Aminosäuresubstitutionen im Peptid NIH-6342 auf die Bindung von 2F5 im ELISA.	87
Abb. III.23: Gesteigerte HIV-Provirusintegration durch Hemmung von 2F5.	89
Abb. III.24: Charakterisierung der generierten HIV-E1/E2-Konjugate mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse.	90

Abb. III.25: Nachweis bindender Antikörper gegen die synthetischen Peptide HIV-E1/E2.	91
Abb. III.26: Test der Boost-Seren nach Immunisierung im <i>in vitro</i> -Neutralisationsassay.	92
Abb. III.27: HIV-Neutralisation durch Immunsereen und isolierte Immunglobuline G.	94
Abb. III.28: PERV-Neutralisation durch Immunsereen und isolierte Immunglobuline G.	95
Abb. III.29: Bindung der induzierten Antikörper an die Peptide HIV-E1/E2.	96
Abb. IV.1: Vergleich der Nukleinsäure- (Abb. A) und Aminosäuresequenzvariation (Abb. B) zwischen verschiedenen Isolaten des Subtyps C aus Südafrika, Botswana und Indien mit der Consensussequenz (der Subtypen B und C) und verschiedenen Impfstoffsequenzen (Gaschen et al., 2002).	103
Abb. IV.2: Bindungs- und Neutralisationsmodell für PERV-neutralisierende Antikörper.	112
Abb. IV.3: Schematische Darstellung der gp41-Ektodomäne in der für die Neutralisation durch 2F5 relevanten Struktur.	116
Abb. IV.4: Schematische Darstellung der Bindung von 2F5 in zwei Stufen.	118
Abb. IV.5: Vergleich der Lokalisation der Epitope neutralisierender und induzierter Antikörper innerhalb der HIV-gp41- und PERV-p15E-Ektodomäne	119

Abkürzungsverzeichnis

add	addieren auf ein Gesamtvolumen von
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrom</i>
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bzw.	beziehungsweise
CBP	Calmodulin-Bindeprotein
CCR	Chemokinrezeptoren für CC-Chemokine (Chemokingruppe mit zwei aufeinanderfolgenden Cysteinen)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CHR	C-terminale Helixregion
CTL	Cytotoxische T-Zellen
CXCR	Chemokinrezeptoren für CXC-Chemokine (Chemokingruppe bei der zwei aufeinanderfolgende Cysteine durch eine Aminosäure getrennt sind)
DC	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	Aqua bidest
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
Env	<i>envelope protein</i> , Hüllprotein
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FeLV	<i>feline leukemia virus</i> , Katzen-Leukämie-Virus
FIV	<i>feline immune deficiency virus</i> , Katzen-Immundefizienz-Virus
FKS	fötales Kälberserum
FP	Fusionspeptid
Gag	<i>group specific antigen</i> , Gruppenspezifisches Antigen
HAART	<i>highly active antiretroviral therapy</i>
HEPS	Hochgradig HIV-exponierte seronegative Personen
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HTLV	<i>human T cell leukemia virus</i> , humane T-Zell-Leukämie-Virus
Ig	Immunglobulin
IN	Integrase
IR	Infrarot
kA	Assoziationskonstante
kD	Dissoziationskonstante
kB	Kilo-Base
kD	Kilo-Dalton
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Mio	Millionen
Mrd	Milliarden
mut	mutiert
MVA	<i>modified vaccinia Ankara virus</i>
Nef	negativer Faktor
NHR	N-terminale Helixregion
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernmagnetresonanz
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE1	Peptid, abgeleitet von Epitopregion 1
PE2	Peptid, abgeleitet von Epitopregion 2
PERV	Porzines endogenes Retrovirus
PHI	Primäre HIV-Infektion
Pol	Polymerase
POD	Peroxydase
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SCID	<i>severe combined immune deficiency</i>
SHIV	SIV-HIV-Hybrid-Viren
SIV	<i>simian immune deficiency virus</i> , Affen-Immundefizienz-Virus
SPF	specified pathogen free
Tat	Transaktivator
TM	Transmembran-
UNAIDS	<i>United Nations Department of AIDS</i>
Vif	<i>virion infectivity factor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
Wt	Wildtyp

Aminosäuresequenzen sind im Ein-Buchstaben-Code dargestellt:

A:	Alanin
C:	Cystein
D:	Asparaginsäure
E:	Glutaminsäure
F:	Phenylalanin
G:	Glycin
H:	Histidin
I:	Isoleucin
K:	Lysin
L:	Leucin
M:	Methionin
N:	Asparagin
P:	Prolin
Q:	Glutamin
R:	Arginin
S:	Serin
T:	Threonin
V:	Valin
W:	Tryptophan
X:	beliebige Aminosäure
Y:	Tyrosin

Die Basen von Oligonucleotidsequenzen sind in folgendem Code aufgeführt:

A:	Adenin
C:	Cytosin
G:	Guanin
T:	Thymin

I **Einleitung**

Infektionskrankheiten sind seit jeher eine der häufigsten Todesursachen weltweit. Die intensive Suche nach Mitteln zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten beschäftigt die Menschheit seit über 3000 Jahren. Es ist bekannt, dass bereits zur Zeit Pharaos Ramses V. (1148-1136 v. Chr.) verheerende Pockenepidemien in Ägypten, China und Indien aufgetreten sind. In dieser Zeit wurden auch die ersten belegbaren Impfungen durch Übertragung von getrocknetem Pockenschorf auf noch nicht erkrankte Personen durchgeführt.

In den vergangenen Jahrhunderten waren es vor allem bakterielle Infektionen, wie Pest (*Yersinia pestis*), Cholera (*Vibrio cholerae*) oder Tuberkulose (*Mycobacterium tuberculosis*) die zu großen Pandemien mit hoher Letalität führten. Aber auch Virusinfektionen, durch Pocken-, Influenza-, Masern- oder Polioviren forderten viele Todesopfer.

Obwohl heute immer noch jährlich ca. zwei Millionen Menschen an den Folgen einer Tuberkuloseerkrankung sterben (Young, 2003), sind mit der Entdeckung der Antibiotika durch A. Fleming die meisten bakteriellen Infektionen therapierbar geworden. Pest, Cholera und Tuberkulose, die während großer Epidemien regional über 30% der Bevölkerung auslöschten, spielen heute in den Industrieländern nur noch eine untergeordnete Rolle.

Dagegen haben in den letzten Jahrzehnten Virusinfektionen einen immer höheren Stellenwert eingenommen. Besonders in den Entwicklungsländern treten immer wieder neue virusassoziierte Krankheiten, wie z.B. AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*), SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*) oder durch Filoviren ausgelöste hämorrhagische Fieber, auf. Diese Viren werden durch die gewachsene Mobilität der Menschen schnell verbreitet und stellen eine neue Herausforderung an die Entwicklung effektiver Therapien und präventiver Impfstoffe dar. Aber auch schon seit langem bekannte Virusinfektionen, wie die durch Influenza-, Masern-, oder Hepatitisviren hervorgerufenen Erkrankungen sind keinesfalls besiegt und fordern jedes Jahr Millionen Todesopfer.

Obwohl die Entdeckung der Viren und der wissenschaftliche Beweis für die mit ihnen assoziierten Krankheiten erst ca. 100 Jahre zurück liegt, sind sie seit Anbeginn Begleiter der Menschheit. Sie unterscheiden sich grundlegend von anderen Krankheitserregern, wie z.B. Bakterien oder Pilzen. Viren haben keinen eigenen Stoffwechsel, zur Replikation nutzen sie den Syntheseapparat der Wirtszelle. Diese enge Verbindung zwischen Virus und Wirtszelle macht eine Therapie oft sehr schwierig. Antivirale Medikamente sind meist mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden, da sie in die Stoffwechselprozesse der Wirtszelle eingreifen. Breit wirkende Therapeutika, wie z.B. Antibiotika zur Therapie bakterieller Infektionen,

stehen nicht zur Verfügung. Auch wenn die Entwicklung antiviraler Therapien in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht hat, kann so oft nur die Überlebenszeit der Patienten verlängert, jedoch keine Heilung erreicht werden. Des Weiteren sind mit der antiviralen Therapie meist hohe Kosten verbunden, die von den Gesundheitssystemen der Entwicklungsländer nicht aufgebracht werden können. Die HAAR-Therapie (*highly active antiretroviral therapy*) zur Behandlung von AIDS-Patienten verursacht Kosten von 13000-23000 US-\$ pro Jahr und Patient (Freedberg et al., 2001). So steht der Mehrheit der HIV-Infizierten keine lebensverlängernde antivirale Therapie zur Verfügung.

Die optimale und kostengünstigste Strategie zur Bekämpfung von Virusepidemien ist nach wie vor die präventive Vakzinierung. Der Erfolg großer Impfkampagnen, wie z.B. gegen das Pocken- oder Poliovirus, zeigt die Effektivität solcher.

I.1 Retroviren

Retroviren (Familie Retroviridae) finden sich bei allen Vertebraten - von Säugetieren, Vögeln, Reptilien bis zu Fischen. Sie wurden erstmals 1908 durch Ellermann und Bang beschrieben. Peyton Rous konnte 1911 zeigen, dass durch zellfreien Extrakt aus Geflügelsarkomen diese Tumorerkrankung auf gesunde Hühner übertragen werden kann. Das in diesen Extrakten enthaltene Virus wurde nach ihm Rous-Sarkom-Virus (RSV) genannt.

1970 machten D. Baltimore, H.M. Temin und S. Mituzami die Entdeckung, dass diese Viren in der Lage sind, RNA zurück in DNA zu übersetzen. Bis zu diesem Zeitpunkt war man davon ausgegangen, dass die Übersetzung von DNA in RNA nur in eine Richtung möglich ist. Diese reverse Transkription wird durch die reverse Transkriptase initiiert. Dieses Enzym ist der Namensgeber der Retroviren.

Bis 1971 waren Retroviren nur in der Tierwelt beschrieben worden. 1971 wurde erstmals ein humanes Retrovirus, das humane Spumaretrovirus (HSRV), aus menschlichem Gewebe isoliert. R. Gallo brachte 1980 erstmals ein humanes Retrovirus mit Tumorbildung beim Menschen in Zusammenhang. Das von ihm beschriebene HTL-Virus (*Human T-Cell Leukemia Virus*) gilt als Auslöser von T-Zell-Leukämien. 1983 identifizierten L. Montagnier und R. Gallo das humane Immundefizienzvirus HIV-1 als Retrovirus und Auslöser der Immunschwächekrankheit AIDS. Auch können häufig Tumorerkrankungen mit Retrovirusinfektionen in Verbindung gebracht werden. Für diese Entdeckung erhielten John Michael Bishop und Harold Eliot Varmus 1989 den Nobelpreis für Medizin.

I.1.1 Einteilung der Retroviren

Die Familie der Retroviridae ist in sieben Genera eingeteilt. Die derzeit gängige Einteilung mit typischen Vertretern ist in Tabelle 1.1. dargestellt. Bis zum Jahr 1999 erfolgte die Einteilung in drei Unterfamilien: Onkoviren, Lentiviren und Spumaviren, wobei die Onkoviren anhand ihrer morphologischen und genetischen Unterschiede in weitere fünf Genera unterteilt wurden.

Weiterhin wird zwischen exogenen und endogenen Retroviren unterschieden. Endogene Retroviren sind in das Genom aller Zellen des Organismus integriert und werden vertikal über Keimbahnzellen übertragen. Die Eliminierung endogener Retroviren durch Züchtung oder Haltung unter SPF-Bedingungen (*Specified Pathogen Free*) ist daher nicht möglich. Obwohl diese Viren nicht dem Evolutionsdruck unterliegen und daher viele genetisch verkrüppelt sind, kann es unter bestimmten Umständen zur Produktion exogener infektiöser Partikel kommen. Im Rahmen der Forschung zur Virussicherheit der Xenotransplantation konnte das z.B. für die porzinen endogenen Retroviren (PERVs) gezeigt werden. Nach Stimulation von primären Schweinelymphozyten konnte eine Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln beobachtet werden, die *in vivo* an humane 293 Zellen adaptierten und diese produktiv infizierten (Denner et al., 2003; Specke et al., 2002).

Im Unterschied zu den endogenen Retroviren erfolgt die Übertragung der exogenen Retroviren von Organismus zu Organismus. Durch spezifizierte pathogenfreie Haltung oder Züchtung kann das Virus meist leicht eliminiert werden.

Retroviren sind wirtsspezifisch, jedoch gilt die Übertragung einiger Retroviren über die Artgrenze hinaus, wie z.B. der Affen-Immundefizienzviren (SIV) oder des murine Leukämievirus (MuLV), als gesichert.

Tab. I.1: Einteilung der Retroviren und charakteristische Vertreter (nach Modrow, 2003)

Genus	Virus	Typ
α -Retrovirus	Rous-Sarkom-Virus (SSV)	exogen
	Aviäre Leukoseviren (ALV)	exogen
β -Retrovirus	Mason-Pfizer-Affenvirus (MPMV)	exogen
	Maus-Mammatumovirus (MMLV)	endogen/exogen
γ -Retrovirus	Moloney-Maus-Leukämie-Virus (Mo-MuLV)	exogen
	Friend-Maus-Leukämie-Virus (F-MuLV)	exogen
	Felines Leukämie-Virus (FeLV)	exogen
	Porzines endogenes Retrovirus (PERV)	endogen
δ -Retrovirus	Humane T-Zell-Leukämie-Viren (HTLV- 1/HTLV-2)	endogen
ε -Retrovirus	Zander-Hautsarkomvirus (WDSV)	exogen
Lentivirus	Humane Immundefizienzviren (HIV-1/HIV-2)	exogen
	Simiane-Immundefizienzviren (SIV)	exogen
	Felines Immundefizienzvirus (FIV)	exogen
	Bovine Immundefizienzviren (BIV)	exogen
Spumavirus	Simianes Foamyvirus (SFV)	exogen

I.1.2 Genomstruktur der Retroviren

Das Genom der Retroviren besteht aus zwei identischen, einzelsträngigen RNA-Molekülen, die an den Enden polyadenyliert sind. Die Länge variiert zwischen 8 - 11 kB.

Alle Genome bestehen zumindest aus drei Genen: Gag (gruppenspezifische Antigene), Pol (reverse Transkriptase, Integrase, Protease) und Env (Hüllproteine). Diese Strukturgene sind von LTR-Sequenzen (long terminal repeats) eingerahmt, die Start und Ende der Transkription steuern. Diese Wiederholungssequenzen enthalten U3- (unique), R- (redundant) und U5-Regionen, die in gleicher Orientierung vorliegen (Abb. I.1). Genetische Veränderungen an der LTR können deutlich Veränderungen in der Virusreplikation zur Folge haben.

Für das porzine endogene Retrovirus (PERV) konnte in vivo gezeigt werden, dass das repetitive Einfügen kurzer Sequenzen während serieller Passagen zur gesteigerten LTR-Promotoraktivität und damit zur deutlich erhöhten Virusreplikation führt. Diese Steigerung wird auf die Multimerisierung von Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors NF-Y

zurückgeführt, die dem Virus zusätzliche Replikation in den infizierten Zellen sichert (Denner et al., 2003).

Komplexe Retroviren, wie HIV, besitzen zusätzlich Gene, die für regulatorische und akzessorische Proteine codieren (*Rev*, *Nef*, *Tat*, *Vif*, *Vpr*, *Vpu*). Regulatorische Proteine können z.B. als Transaktivatoren (Tat-Proteine = *transactivator of transkription*) oder als Expressionsregulatoren (Rev-Protein = *regulator of gene expression of virion proteins*) fungieren. Akzessorische Proteine, wie z.B. das Vif- (*viral infectivity factor*) oder das Nef-Protein (*negative factor*) steigern vor allem die Infektiosität der Virionen.

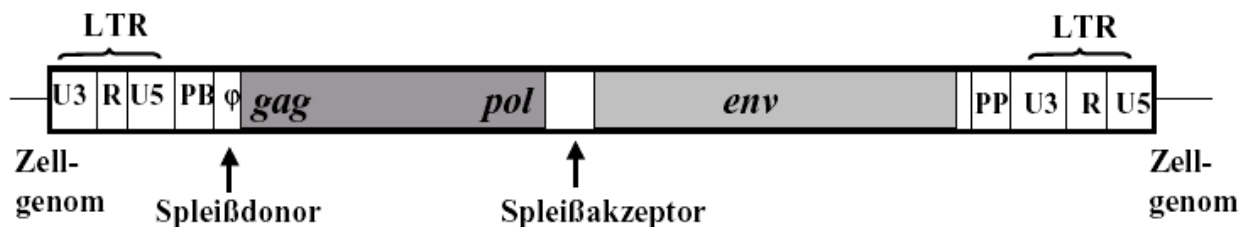


Abb. I.1: Schematische Darstellung der retroviralen Genomorganisation der in das Zellgenom integrierten Provirus-DNA:

U3 und U5: besondere (unique) Regionen; R= wiederholte (redundant) Regionen; PB: (primer binding) Bindungsstelle für tRNA im RNA-Genom; ϕ : Verpackungssignal für die virale genomische RNA; PP: Polypurinstelle; Spleißdonor/-akzeptor: Lage der Spleißstellen für die Synthese jener RNA, von der die env-Proteine translatiert werden; LTR: (long terminal repeat) Anordnung der Sequenzelemente nach Bildung durch die reverse Transkriptase

I.1.3 Morphologie und Virusproteine der Retroviren

Retrovirale Partikel haben einen Durchmesser von 80-130nm und bestehen aus einem inneren Kapsid, umgeben von einer äußeren Hülle. Die Hüllmembran besteht aus einer Lipid-Doppelschicht und ist von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle abgeleitet.

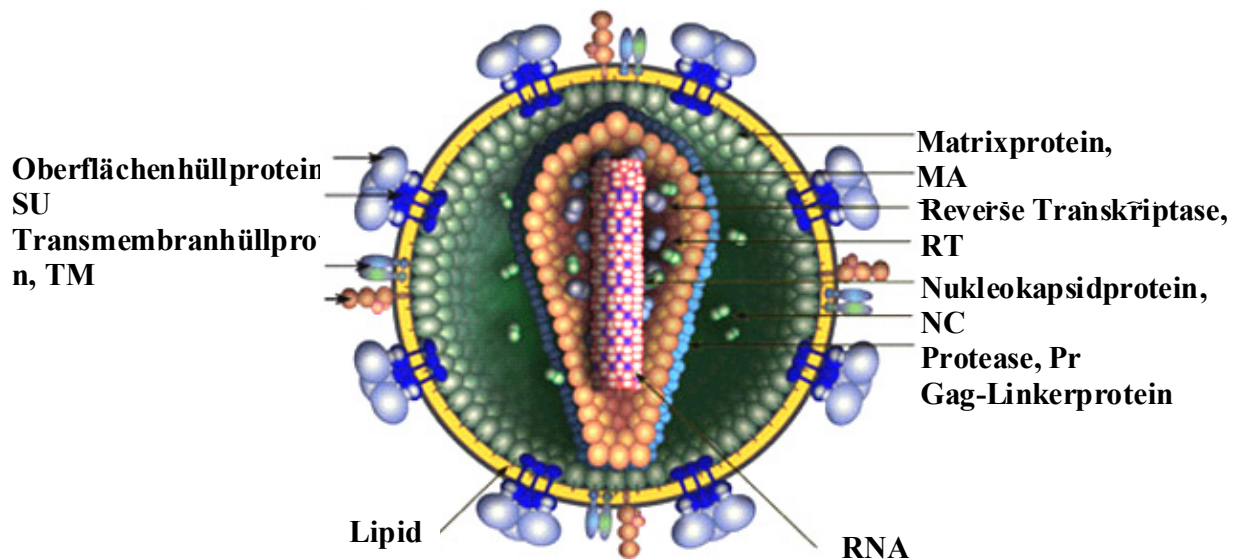


Abb. I.2: Schematische Darstellung eines Lentivirus (HIV-1).
 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/STRUCTURE/INDEX.HTML>)

I.1.3.1 Hüllproteine

Die Virusmembran ist mit viralen Glykoproteinen assoziiert, die auf der Oberfläche intakter Partikel trimere Komplexe (*Spikes*) ausbilden. Diese Komplexe interagieren mit den Rezeptoren und Korezeptoren auf der Zelloberfläche und initiieren so die Infektion der Zielzelle. Sie setzen sich aus dem Transmembranhüllprotein (TM) und dem nicht kovalent assoziierten Oberflächenhüllprotein (SU) zusammen. Die Hüllproteine werden von einer einfach gespleißten RNA als gemeinsames Vorläuferprotein translatiert und während der Virusmorphogenese von einer, mit dem Golgi-Apparat assoziierten, zellulären Protease gespalten (Coffin et al., 1997).

Das Oberflächenhüllprotein des HIV-1 hat ein Molekulargewicht von 120kDa, das des PERV vom 70kDa. Die Oberflächenhüllproteine der Retroviren weisen meist einen sehr hohen Glykosylierungsgrad und eine hohe Sequenzvariabilität auf. Mit bis zu 32 Glykolysierungsstellen zählt gp120 zu den am stärksten glykolysierten Proteinen. Bis zu 50% der Molekülmasse besteht aus Kohlehydraten (Leonard et al., 1990). Durch Oligomerisierung, Glykolysierung, Konformations- und Strukturänderungen können neutralisationsresistente Virusvarianten gebildet werden (Evans und Desrosiers, 2001). Das gp120 ist in eine äußere und eine innere Domäne gefaltet, die durch eine Brücke aus vier β -Faltblättern (*β -Bridging Sheet*) miteinander verbunden sind. Die äußere Domäne besteht aus fünf variablen Schleifen (*Loops*), V1-5, die durch Disulfidbrücken stabilisiert werden. Die CD4-Rezeptorbindungsstelle ist zwischen diesen Domänen in eine Vertiefung eingebettet.

Die Bindung des Rezeptors führt zu einer Konformationsänderung, in deren Folge die Chemokinrezeptorbindungsstelle freigelegt wird.

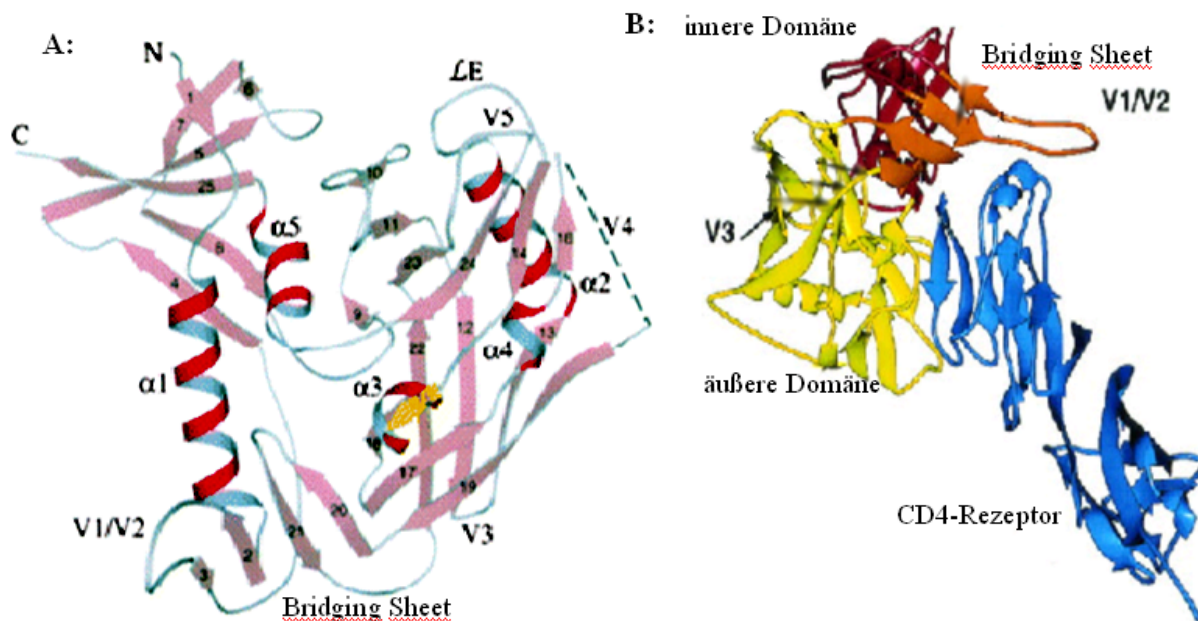


Abb. I.3: Strukturmodell der HIV-1 Oberflächenproteins gp120

A: Anordnung der variablen Schleifen (V1-V5) im gp120 (Klasse und Sattentau, 2002). B: Computermodell der Raumstruktur des gp120-CD4-Komplexes (Rizzuto et al., 1998)

Im Gegensatz zu den Oberflächenhüllproteinen sind transmembrane Hüllproteine relativ schwach (HIV-1-gp41, drei Glykosylierungsstellen) oder gar nicht (PERV-p15E) glykosyliert. Im nativen Zustand sind sie nahezu vollständig vom Oberflächenprotein verdeckt und für das Immunsystem schwer zugänglich.

Das Transmembranhüllprotein untergliedert sich in einen extraviralen (Ektodomäne) und einen intraviralen (zytoplasmatischen) Bereich und ist über eine ca. 20 Aminosäurereste lange, zwischen diesen beiden Bereichen liegende, stark hydrophobe Sequenz in der Membran verankert. Die Ektodomäne untergliedert sich in das Fusionspeptid (FP), die N-terminale Helixregion (NHR), eine Cysteinschleife (C-C Loop) mit immundominanter (IDO) und immunsuppressiver Domäne (ISU), eine C-terminale Helixregion (CHR) und in einen kurzen membranproximalen Bereich (Abb. I.4A). Von der ISU-Domäne abgeleitete Peptide wirken *in vitro* Proliferationshemmend (Denner et al., 1994, 1996) und modulieren die Cytokinproduktion (Denner, 1998). Der zytoplasmatische Teil kann je nach Virustyp unterschiedlich lang sein. Während er bei Gammaretroviren nur 30-40 Aminosäuren enthält,

verfügen Lentiviren über einen relativ großen intraviralen Anteil (ca. 150 AS), der bei HIV zwei α -Helices enthält. Es ist unklar, welche Rolle der zytoplasmatische Teil während der Infektion einnimmt. Versuche, in denen Teile des zytoplasmatischen Bereichs deletiert wurden, zeigen jedoch einen deutlich Rückgang der Infektiosität. Für Lenti- und Gammaretroviren sind gegen den intraviralen Teil gerichtete, neu-tralisierende Antikörper beschrieben worden (Cleveland et al., 2003, Nick et al., 1990), deren Wirkmechanismus allerdings völlig unklar ist.

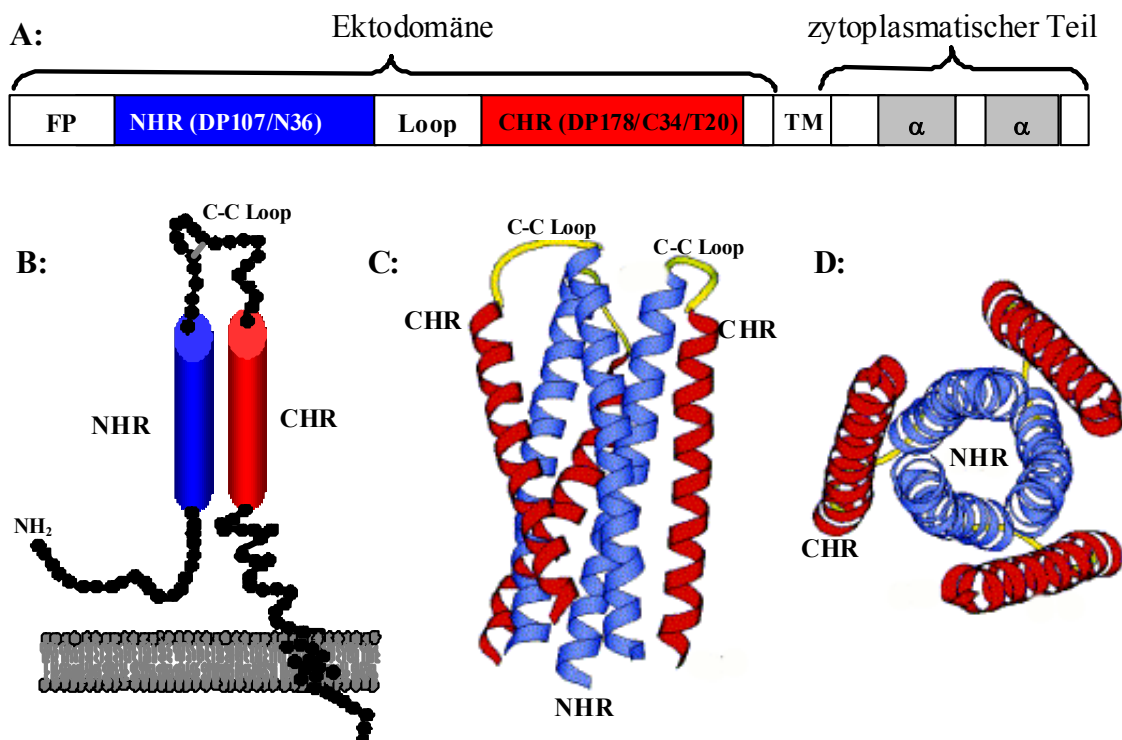


Abb. I.4: Strukturmodell des Transmembranhüllproteins gp41 von HIV-1

A: Schematische Darstellung von gp41 (FP: Fusionspeptid; NHR: N-terminale Helixregion; Loop: Cystein-Cystein-Schleife; CHR: C-terminale Helixregion; TM: Transmembrandurchgang; α : α -Helix im zytoplasmatischen Teil) B: Haarnadelkonformation des Transmembranproteins nach Zusammenlagerung der Helices (Fiebig et al., 2003) C: Darstellung der Sechshelix-Konformation des gp41-Trimers nach Zusammenklappen der Helices (Marti et al., 2004) D: Aufsicht auf die Coiled Coil-Struktur der Sechshelix-Konformation (Marti et al., 2004)

Transmembran- und Oberflächenhüllprotein sind die einzigen, auf der Oberfläche von Retroviren exponierten viralen Proteine und damit die wichtigsten Angriffspunkte einer humoralen neutralisierenden Immunantwort. HIV-neutralisierende Antikörper gegen Gag-Proteine der Retroviren (Kageyama et al., 1996) sind zwar von einigen Gruppen beschrieben

worden, spielen aber bei der Induktion einer virushemmenden Immunantwort eine untergeordnete Rolle. Im Laufe einer Infektion werden hohe Antikörpertiter gegen virale Proteine (wie Gag, SU und TM) gebildet, trotzdem kommt es im infizierten Wirt nicht zu einer effektiven Neutralisation. Nur wenige breit neutralisierende Antikörper konnten bisher aus HIV-Patienten isoliert werden (Tab. I.5), die Induktion solcher Antikörper ist trotz intensiver Bemühungen bisher noch nicht gelungen.

1.1.3.2 Gruppenspezifische Antigene (Gag-Proteine)

Zu den gruppenspezifischen Antigenen gehören die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine. Sie erfüllen verschiedene Funktionen, die z.B. zur Partikelbildung und -freisetzung, Struktur und Infektiosität der reifen Virionen beitragen. Alle Gag-Proteine werden als ein gemeinsames Vorläuferprotein translatiert, das im Verlauf der Virusmorphogenese von einer viralen Protease in die einzelnen Komponenten gespalten wird. Die sequentielle Abfolge der einzelnen Gag-Proteine im Vorläuferprotein ist bei allen Retroviren gleich, die Größe der einzelnen Komponenten kann dagegen sehr unterschiedlich sein. Das HIV-1 *gag*-Gen kodiert ein 55kDa großes Vorläuferprotein, das in ein 17kDa großes Matrixprotein, ein 24kDa großes Kapsidprotein, ein 7kDa großes Nukleokapsidprotein und in die Linkerproteine p6, p2 und p1 gespalten wird (Wiegers et al., 1998). Das Gag-Vorläuferprotein der porzinen endogenen Retroviren (60kDa) wird in das p27-Kapsidprotein (27kDa), das p15-Matrixprotein (15kDa), das p7-Nukleokapsidprotein (7kDa) sowie in das p12-Linkerprotein (12kDa) gespalten.

Die Matrixproteine sind über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste, mit der Innenseite der Hüllmembran assoziiert. Im Partikelinneren bilden die Kapsidproteine, je nach Virustyp, ein konisches (Lentiviren) oder ikosaedrisches (α -, β -, γ -, δ - und Spumaviren) Viruskapsid. Es umschließt zwei identische RNA-Moleküle als Virusgenom, die Nukleokapsidproteine und die viralen Enzyme. Die Nukleokapsidproteine interagieren mit der RNA und bilden gemeinsam einen Ribonukleoproteinkomplex.

1.1.3.3 Die viralen Enzyme

Das retrovirale Genom codiert die Enzyme Integrase, Protease und die reverse Transkriptase. Sie sind Produkte des *pol*-Gens und werden durch eine Leserasterverschiebung während der Gag-Polypolypeptid-Translation als gemeinsames Gag/Pol-Vorläuferprotein synthetisiert. Durch diese Leserasterverschiebung wird das *gag*-Stoppcodon überlesen und dem Gag-Polypeptid werden die Pol-Domänen angehängt. Dieses Ereignis findet etwa bei jedem zwanzigsten

Translationsvorgang statt. Die Proteolyse in die aktiven Enzyme erfolgt während der Virusreifung im bereits freigesetzten Partikel.

Die Integrase wirkt als Endonuklease und Ligase. Sie schneidet die Enden der doppelsträngigen proviralen DNA und katalysiert die kovalente Integration in das Genom der Wirtszelle.

Die Protease liegt im aktiven Zustand als Dimer aus zwei identischen Untereinheiten vor. Sie ist für die Proteolyse der Gag- bzw. Gag/Pol-Vorläuferproteine in die strukturellen Untereinheiten bzw. funktionellen Enzyme verantwortlich. Inhibitoren der viralen Protease des HIV simulieren die Proteasespaltstellen der Vorläuferproteine und können die Reifung der Partikel effektiv hemmen.

Die reverse Transkriptase kann als RNA- oder DNA-abhängige DNA-Polymerase oder auch als RNAase wirken. Sie katalysiert die Umschreibung der viralen RNA in provirale DNA und baut nach der Synthese der DNA/RNA-Hybriddoppelstränge den RNA-Anteil ab. Die reverse Transkriptase besitzt keine Mechanismen zur Kontrolle der Lesegenauigkeit und baut daher mit einer Wahrscheinlichkeit von $1:10^{-3}$ - 10^{-4} falsche Basen in den neusynthetisierten DNA-Strang ein. Diese hohe Fehlerrate sichert dem Virus eine hohe Sequenzvariabilität. Verschiedene Nukleosidanaloga, wie z.B. Azidothymidin (AZT) oder Didesoxycytidin, werden derzeit als Inhibitoren der reversen Transkriptase zur antiretroviralen Therapie eingesetzt. Der Einbau dieser chemisch veränderten Basenderivate in den neusynthetisierten DNA-Strang führt zum Kettenabbruch. Neben den Nukleosidanaloga werden auch Nicht-Nukleosidanaloga als RT-Inhibitoren eingesetzt.

I.1.4 Replikation

Die Adsorption der Retroviren an die Zielzelle erfolgt über spezifische zelluläre Rezeptoren in Abhängigkeit vom jeweiligen Virustyp. Sie wird durch den externen Teil des Membranproteinkomplexes vermittelt. Am besten untersucht ist die Replikation der HI-Viren, daher soll der Infektionszyklus hier exemplarisch am HI-Virus erklärt werden.

Der erste zelluläre Reaktionspartner der HI-Viren ist das CD4-Protein, das über eine konservierte Region im trimeren Komplex des Oberflächenproteins (gp120) gebunden wird. Das CD4-Molekül ist auf der Oberfläche von T-Helferzellen, Makrophagen, Monozyten und Fibroblasten exponiert. Sein natürlicher Ligand während der Induktion einer zellulären Immunantwort ist eine konstante Region innerhalb der MHC-Klasse-II-Moleküle. Die Bindung des CD4-Rezeptors an den gp120-Komplex ist konformationsabhängig. Sie bewirkt

Konformationsänderungen im gp120, durch die weitere Wechselwirkungen mit Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzelle ermöglicht werden. Das HI-Virus nutzt die Chemokinrezeptoren CXCR4 oder CCR5 als Korezeptoren, die an die variablen Regionen der gp120 V1/2- und V3-Schleifen binden. Der Chemokinrezeptor CXCR4 wird auf der Oberfläche von T-Lymphozyten, CCR5 auf der Oberfläche von Makrophagen und Monozyten exprimiert. Virusvarianten, die zum Eintritt in die Zelle CXCR4 als Korezeptor nutzen, werden als lymphotrop, CCR5 bindende als makrophagotrop bezeichnet.

Das Transmembranhüllprotein vermittelt die Fusion zwischen Virus und der Zytoplasmamembran der Zielzelle. Die Bindung des Oberflächenhüllproteins an den bzw. die Rezeptoren bewirkt Konformationsänderungen, durch die eine stark hydrophobe Sequenz am aminoterminalen Teil des TM-Hüllproteins freigelegt wird. Dieses ca. 25 Aminosäuren lange Fusionspeptid dient als hydrophober Anker, der sich während der Infektion in die Lipidmembran der Zielzelle einlagert und so die Verschmelzung mit der Virushülle vermittelt. Der Membranverschmelzung geht die Ablösung von gp120 und das Zusammenklappen der beiden Helices des Transmembranproteins voraus (Abb. I.5).

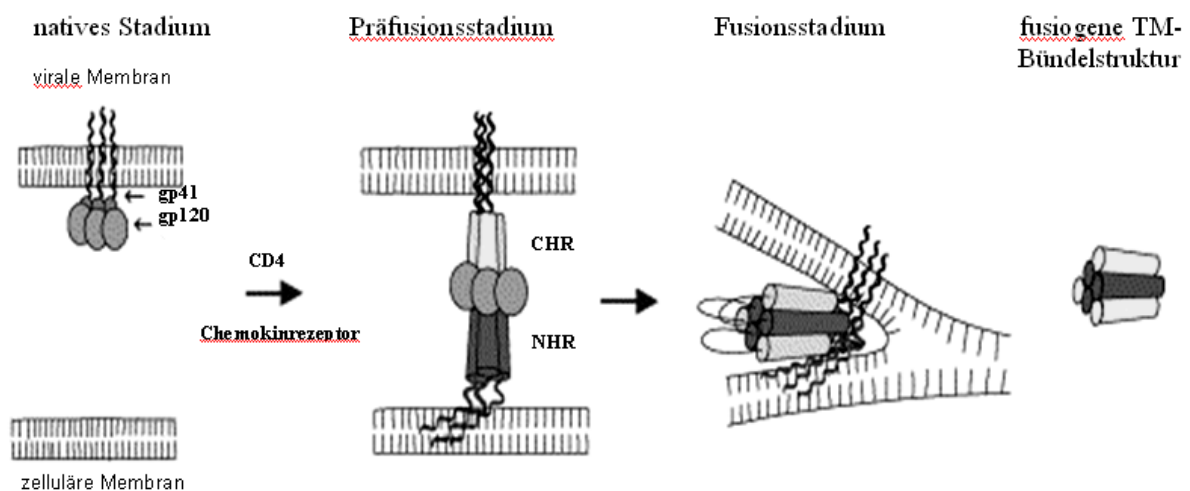


Abb. I.5: Schematische Darstellung der Konformationsänderungen des HIV-Glykoprotein-Komplexes während Membranfusion (Liu et al, 2003).

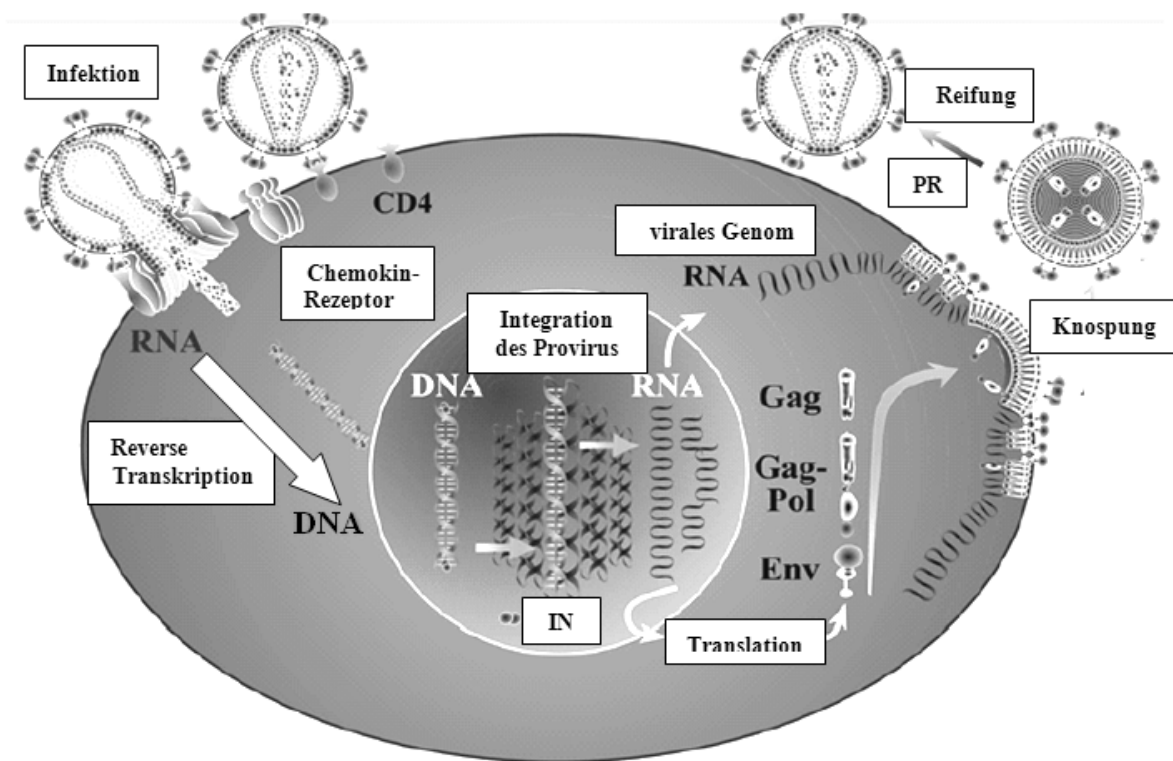


Abb. I.6: Replikationszyklus von HIV-1:

Der Infektionsvorgang beginnt mit der Anheftung von gp120 an CD4, gefolgt von der gp41-vermittelten Membranfusion. Nach der reversen Transkription erfolgt die Integration des doppelsträngigen DNA-Provirus in das Genom der Wirtszelle. Die Bildung neuer Viruspartikel beginnt mit der Transkription der frühen Gene und endet mit der Knospung und Reifung. (<http://www.viro.med.uni-erlangen.de/schubert/Ws/Teil2.pdf>)

Nach der Aufnahme des Virus-Kapsids in das Zytoplasma der Zielzelle, folgt der *Uncoating*-Prozess, durch den die virale RNA in das Zytosol freigesetzt wird. Durch reverse Transkription des viralen RNA-Genoms wird das doppelsträngige DNA-Provirus synthetisiert. Im Zellkern katalysiert die virale Integrase die kovalente Integration des Provirus in das Wirtszellgenom.

Die späte Phase der Virusreplikation beginnt mit der Transkription der viralen Gene durch die zelluläre RNA-Polymerase II. Die viralen Proteine und das Virusgenom lagern sich an der Zytoplasmamembran an. In der Folge kommt es zur Knospung der unreifen Partikel von der Zelloberfläche. Erst nach der Spaltung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine durch die virale Protease entstehen infektiöse Partikel.

I.1.5 Gammaretroviren

Gammaretroviren sind weniger komplex als Lentiviren aufgebaut, sie exprimieren keine regulatorischen oder akzessorischen Proteine.

Als Krankheitserreger spielten Gammaretroviren bislang nur in der Veterinärmedizin eine Rolle. Das feline Leukämievirus (FeLV) verursacht bei der Hauskatze Leukämien, Immunschwäche und opportunistische Infektionen, die oft tödlich verlaufen. Wie für die Lentiviren wurden auch für Gammaretroviren Transspeziesübertragungen unter natürlichen Bedingungen beschrieben (Denner, 2000). Die Übertragung eines endogenen Mausretrovirus (MuLV) auf Gibbonaffen ruft beim neuen Wirt als exogenes Retrovirus (*Gibbon ape leukemia virus*; GaLV) myeloische Leukämien und Lymphome hervor (Lieber et al., 1975).

Viele Transspeziesübertragungen führten im neuen Wirt zu ausgeprägten Krankheitsbildern. Aufgrund der besonderen Situation während der Xenotransplantation wird das Risiko der Übertragung von porzinen endogenen Retroviren (PERV), besonders intensiv erforscht. Das Schwein gilt aus verschiedenen Gründen als favorisierte Spenderspezies (Tab. I.2), die potentielle Gefahr einer Transspeziesübertragung von PERVs auf Transplantatempfänger, kann derzeit nicht ausgeschlossen werden.

I.1.5.1 Porzine endogene Retroviren (PERVs)

PERVs gehören zu den Gammaretroviren. Sie zeigen eine enge Verwandtschaft mit den Mäuseleukämieviren (MuLV), Katzenleukämieviren (FeLV) und dem Leukämievirus der Gibbonaffen (GaLV). Diese Viren rufen bei ihren Wirten Leukämien und Immundefizienzen hervor. PERVs sind endogen, d.h. sie werden vertikal über die Keimbahn nach den Mendelschen Regeln übertragen. Durch den fehlenden Evolutionsdruck sind die meisten Proviren degeneriert und nicht mehr replikationsfähig. Erstmals wurde PERV 1970 aus der porzinen Nierenzell-Linie PK-15 isoliert und charakterisiert (Breese, 1970). Es existieren 3 Subtypen (PERV-A, -B, -C), die sich vor allen durch ihre Hüllproteine unterscheiden. Durch *in vitro* Versuche konnte gezeigt werden, dass PERVs humane Zellen produktiv infizieren können (Patience et al., 1997). Untersuchungen zur Zytokinmodulation durch das transmembrane Hüllprotein haben gezeigt, dass die Veränderung der Zytokinexpression den Veränderungen durch gp41 ähnlich ist. Obwohl PERVs im Schwein apathogen sind, könnte eine Übertragung auf zukünftige Transplantatempfänger zu einem pathogen Infektionsverlauf führen.

I.1.5.2 Xenotransplantation

In Deutschland werden jährlich ca. 2300 Nieren, 550 Herzen und 720 Lebern transplantiert. Auf der Warteliste stehen jedoch 11000 Dialysepatienten, die eine Niere benötigen, und etwa 2000 Herz- und Leberpatienten. Ein Viertel dieser Patienten verstirbt, bevor sie ein Organ erhalten haben. Um diesen permanenten Mangel zu beheben, werden zurzeit verschiedene Lösungswege, wie z.B. das „Tissue-Engineering“ auf Basis von Stammzellen, bioartifizielle Systeme (z.B. *ex vivo* Perfusion) oder die Xenotransplantation diskutiert. Letztere ist von allen Alternativen zur Allotransplantation forschungsmäßig am weitesten fortgeschritten, alle Pro und Contras ihrer Anwendung werden in der Öffentlichkeit bereits intensiv diskutiert. Fortschritte bei der Erzeugung transgener Spendertiere machen die breite klinische Anwendung der Xenotransplantation immer wahrscheinlicher.

Als favorisierte Ausgangsspezies für die Xenotransplantation gilt derzeit das Schwein. Obwohl es phylogenetisch weiter vom Menschen entfernt ist als z.B. die nicht-humanen Primaten der Altwelt, weist es doch einige entscheidende Vorteile auf. Die Vor- und Nachteile verschiedener Spendertiere sind in der nachfolgender Tabelle gegenüber gestellt (nach Denner, 2000).

Tab. I.2: Vergleich der potentiellen Spendertiere für die Xenotransplantation

	Schweine	Nicht-humane Primaten	
		Menschenaffen	Paviane u.ä.
Physiologie	ähnlich	nahezu identisch	ähnlich
Abstoßung	sehr stark	gering	stark
Organgröße	übereinstimmend	übereinstimmend	zu klein
Artenschutz	kein	sehr streng	streng
Gang, Haltung	horizontal	vertikal	vertikal
Gestationszeit	ca. 100 Tage	251-289 Tage	170-193 Tage
Nachkommen	10-18	1, selten 2	1, selten 2
Verfügbarkeit	unbegrenzt	keine	limitiert
SPF-Haltung	möglich	nicht möglich	nicht möglich
mikrobiol. Risiko	gering (durch SPF-Haltung)	sehr groß	sehr groß
Kosten	gering	sehr hoch	sehr hoch

Bevor die Xenotransplantation klinische Realität werden kann, müssen drei Hauptprobleme gelöst werden. Neben der Überwindung der physiologischen und anatomischen Hindernisse, sind es vor allem immunologische Probleme, die eine erfolgreiche Xenotransplantation in der Vergangenheit verhindert haben. Nicht zuletzt muss das mikrobiologische Risiko, also die Gefahr von Xenosen, sowie mögliche Gegenmaßnahmen möglichst umfassend erforscht werden.

1.1.5.3 Physiologische und anatomische Hindernisse der Xenotransplantation

Die physiologischen und anatomischen Unterschiede bei xenogenen Transplantationen sind erheblich, besonders wenn sie nicht innerhalb einer zoologischen Familie oder gar Ordnung durchgeführt werden. Da nicht-humane Primaten aus verschiedenen Gründen als Spendertiere nicht in Betracht kommen (Tab. I.2), muss für die Xenotransplantation auf Spender einer anderen zoologischen Ordnung zurückgegriffen werden. Die Verwendung von Schweinen als potentielle Spenderspezies bringt für die Xenotransplantation gravierende physiologische und anatomische Probleme mit sich. Obwohl die Größe der Organe annähernd identisch ist, bringt das Verlagern der Organe von einer horizontalen, in eine vertikale Orientierung nachweislich eine Beeinträchtigung der Funktion mit sich (West et al., 1987). Auch die Frage nach unterschiedlicher Alterungsdynamik zwischen Spender und Empfänger könnte eine nicht unwesentliche Rolle spielen. Wichtigste physiologische Barriere ist jedoch die Hormon- und Enzymkompatibilität. Bisher sind nur wenige Stoffwechselabläufe in xenogenen Systemen untersucht. Klar ist, dass es neben analog ablaufender, wie z.B. die Insulinproduktion, auch völlig inkompatible Stoffwechselmechanismen gibt, die zwischen Empfänger und Transplantat keine Interaktion erlauben. Genauere Untersuchungen werden zeigen, welche Zellen, Gewebe oder sogar Organe sich für die Xenotransplantation eignen. Trotz dieser physiologischen Hürden konnte in klinischen Studien bereits gezeigt werden, dass bestimmte xenogene Transplantate, wie z.B. Insulin-produzierende Langerhans-Inseln oder Dopamin-produzierende Neuronalzellen, im Menschen ihre Aufgabe erfüllen können.

1.1.5.4 Immunologische Hindernisse

Die Überwindung der immunologischen Abstoßung eines Transplantates ist in den letzten Jahren entscheidend vorangeschritten. Vor allem die Weiterentwicklung der *knock-out*-Technologie und die Entwicklung neuer Medikamente zur Kontrolle der Immunreaktion, scheinen die Transplantation von porzinen Zellen, Geweben oder sogar Organen in den Bereich des Möglichen zu rücken.

Die bei der Xenotransplantation auftretenden immunologischen Reaktionen lassen sich in vier zeitliche Phasen einteilen:

- Die hyperakute vaskuläre Abstoßungsreaktion (HAR)

Die Transplantation von xenogenen Gewebe führt zur Aktivierung des Komplementsystems und damit zu einer hyperakuten Abstoßung des Transplantates nach wenigen Minuten bis Stunden. Ursache für diese Komplementaktivierung ist die Bindung präformierter Antikörper an Kohlehydratepitope auf den Gefäßendothelien des Transplantates. Diese Gal- α -1,3-gal Epitope sind auf den Zellen aller Säuger, ausgenommen des Menschen und einiger nicht-humaner Primaten exponiert (Galili et al., 1993). In den letzten Jahren konnten mehrere wirksame Strategien zur Vermeidung der HAR entwickelt werden. Durch Immunabsorption xenoreaktiver Antikörper (Lucchiari et al. 1997) oder der Einsatz löslicher Komplementinhibitoren konnte die akute Organschädigung deutlich vermindert werden (Kroshus et al., 1995). Den größten Erfolg verspricht jedoch die Entwicklung transgener Schweine. Anfänglich war es jedoch nicht gelungen, die Gene der α -1,3-Galactosyltransferase durch das *knock-out* Verfahren aus dem Genom des Schweins zu entfernen. Daher wurden die Schweine mit Genen ausgestattet, die den Transfer humaner Komplementregulatoren auf die Oberfläche der Zellen des Xenotransplantats bewirken und somit den Angriff durch das Komplementsystem des Empfängers inhibieren (Cozzi und White, 1995). Inzwischen ist es gelungen, die kodierenden Gene der α -1,3-Galactosyltransferase aus dem Genom der Schweine zu entfernen (Dai et al., 2002; Lai et al., 2002).

- Die verzögerte Xenotransplantatabstoßung

Neben der hyperakuten Abstoßungsreaktion bildet der Organismus noch weitere Immunbarrieren, wie z.B. die verzögerte bzw. die akut vaskuläre Abstoßungsreaktion. Die verzögerte Transplantatabstoßung ist charakterisiert durch die Bildung von Thromben, intravasale und interstitielle Fibrinablagerungen sowie der Infiltration des Transplantates mit Killerzellen und Makrophagen. Diese Reaktion ist bisher noch nicht vollständig

verstanden. Man geht davon aus, dass sie ebenfalls durch präformierte Antikörper gegen Kohlehydratepitope auf der Oberfläche des Transplantates ausgelöst wird. Die Bindung dieser Antikörper führt zur Endothelzellaktivierung TypII, die zu einer Abstoßung des Transplantats innerhalb weniger Tage führt. Durch eine weitere genetische Humanisierung des Transplantats könnte auch hier, wie bei der hyperakuten Abstoßung, eine deutliche Reduktion der verzögerten Abstoßungsreaktion erreicht werden.

- Die T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktion

Als vermutlich letzte Phase der akuten Abstoßungsreaktion tritt die T-Zell-vermittelte zelluläre Transplantatabstoßung auf. Diese Reaktion ist, im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Abstoßungsreaktionen, nicht durch Antikörper vermittelt. Die Erkennung des Fremdgewebes erfolgt über die Präsentation von Peptidantigenen durch antigenpräsentierende Zellen, wie z.B. dendritischen Zellen oder Makrophagen. Obwohl bei der Xenotransplantation die T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktion nicht so stark ist wie bei der Allotransplantation, stellt sie das Bindeglied zwischen akuter und chronischer Abstoßungsphase dar. Sie lässt sich in zwei Phasen, der Induktionsphase und der darauf folgenden Effektorphase, einteilen. In der Induktionsphase werden an MHC-Klasse-II-Moleküle gebundene Peptidantigene von $CD4^+$ T-Helferzellen erkannt. In der Effektorphase kommt es durch zytotoxische T-Lymphozyten sowie der massiven Ausschüttung von Zytokinen und $TNF\alpha/\beta$ (Satake et al., 1996, Yamada et al., 1995) zur Schädigung des Transplantats. Zur Unterdrückung dieser Reaktion werden derzeit herkömmliche Immunsuppressiva (z.B. Cyclosporin A, Rapamycin) appliziert. Im Vergleich zur Allotransplantation ist jedoch eine höhere Medikation notwendig, die zur Entwicklung von Tumoren oder Lymphomen in den Rezipienten führen könnte. Eine Lösung des Problems könnte die Entwicklung neuer, speziell auf die Xenotransplantation zugeschnittener Medikamente sein.

- Die chronische Transplantatabstoßung

Die chronische Transplantatabstoßung tritt binnen Monaten bis Jahren auf. Aufgrund von Verengungen durch Gewebeproliferation kommt es zum Verschluss von Gefäßen und zur interstitiellen Gewebsfibrose. Der Verschluss der Gefäße führt zu Nekrosen und letztlich zum Versagen des Transplantats. Die Auslöser dieser Prozesse sind bislang weitgehend unbekannt. Dieser Prozess kann nicht durch den Einsatz von Immunsuppressiva aufgehalten werden.

1.1.5.5 Mikrobiologische Risiken bei der Xenotransplantation

Die mikrobiologische Sicherheit ist ein Aspekt der Xenotransplantation, der nicht von der medizinisch-technischen Durchführbarkeit abhängig ist. Handelt es sich bei den physiologischen, anatomischen und immunologischen Hindernissen um Probleme, die mit den heute zur Verfügung stehenden Mitteln noch nicht oder nur begrenzt überwunden werden können, ist die mikrobiologische Sicherheit eine Frage des Schutzes der Rezipienten und ihrer Kontaktpersonen. Wie die HIV-Epidemie, könnte eine Übertragung von PERVs auf den Menschen verheerende Folgen haben. Deshalb müssen im Vorfeld der Xenotransplantation die Risiken und mögliche präventive und therapeutische Maßnahmen gründlich evaluiert werden.

Die potentielle Verwendung von Schweinen als Spender für Xenotransplantate bringt hinsichtlich der mikrobiologischen Risiken einige Vorteile gegenüber den uns näher verwandten humanen und nicht-humanen Primaten. Die phylogenetische Nähe von Menschen und Primaten könnte eine Vermehrung von pathogenen Erregern im Menschen begünstigen. Ein weiterer großer Vorteil des Schweins ist, dass die meisten Erreger bekannt sind und mittels SPF-Haltung, Antibiotikabehandlung und präventiver Vakzinierung als Infektionsrisiko ausgeschlossen werden können.

Das größte Risiko geht daher von den endogenen Retroviren des Schweins aus, da diese in der Keimbahn verankert und nicht durch Züchtung oder Therapien zu eliminieren sind. Bei bislang durchgeführten Xenotransplantationen, wie der Übertragung von Neuronalzellen auf Parkinsonpatienten, Langerhans'schen Inselzellen auf Diabetespatienten oder extrakorporaler Perfusion von Schweinenieren konnten keine PERV-Infektion nachgewiesen werden (Heneine et al., 1998; Patience et al., 1998; Tacke et al., 2002; Irgang et al., 2003). Ein weiteres Risiko könnten unerkannte Erreger darstellen, die durch allgemeine Hygienemaßnahmen nur teilweise zu eliminieren sind (Denner, 2000).

1.1.5.6 Impfstoffe und neutralisierende Antikörper gegen Gammaretroviren

Neutralisierende Antikörper sind für tierpathogene Gammaretroviren, wie MuLV und FeLV, beschrieben. Das feline Leukämievirus ist derzeit das einzige Retrovirus, gegen das erfolgreich geimpft wird.

In Deutschland sind derzeit verschiedene FeLV-Impfstoffe zugelassen (Tab. I.3). Obwohl neutralisierende Antikörper auch gegen das Transmembranhüllprotein beschrieben sind, kommen bevorzugt gp70-Antigene zur Anwendung (Kleiser et al., 1986; Elder et al. 1987; Nick et al., 1990). Das Transmembranhüllprotein ist weniger sequenzvariabel als das Oberflächenhüllprotein, so binden monoklonale Antikörper gegen p15E aller drei FeLV-Subtypen sowie verschiedene MuLV-Isolate (Youngren et al., 1984). Besonders neutralisierende Epitope im membranproximalen Bereich der C-Helix sind bei den Retroviren stark konserviert. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung mit Vorläuferprotein (gp85) zu einem gesteigerten Titer von virusneutralisierenden Antikörpern führt (Kleiser et al., 1986, Elder et al., 1987; Nick et al., 1990). Keines der zugelassenen Präparate bietet einen 100% Schutz (Sparkes, 1997), von den Herstellern wird eine jährlich Auffrischungsimpfung (30-45€) empfohlen.

Tab. I.3: In Deutschland zugelassene FeLV-Impfstoffe (Quelle: Paul-Ehrlich-Institut, 09/2003)

Handelsname	Antigen	Hersteller
Leukogen	rekombinantes Oberflächenhüllprotein (100µg/p45)	Virbac AG
Eurifel	Lebendimpfstoff, FeLV-Rekombinante des Kanarienvirus(vCP97), Expression des Hüllproteins	Meriel
Fevaxyn	Oberflächenprotein gp70 (in Zellkultur gezüchtet)	Solvay Duphar
Leukocell 2	Oberflächenprotein gp70 (in Zellkultur gezüchtet)	Pfizer

1.1.5.7 Ethische Aspekte der Xenotransplantation

In der Europäischen Union wurden im Jahr 2004 über 205 Millionen Schweine produziert, das entspricht mehr als einem halben Schwein pro Jahr und Einwohner. Die gängige industrielle Schweinehaltung ist nicht artgerecht, da die Tiere in engen, dunklen Ställen (vorgeschriebene Mindestgröße in Deutschland: 2,5 m²) bewegungslos aufgezogen werden. Dies führt oft zu Gelenk- und Muskelkrankheiten, Klauenverletzungen, Verhaltensstörungen

und Kannibalismus. Die oft unwürdige Tierhaltung zur kostengünstigen Erzeugung von tierischen Produkten wird von der überwiegenden Mehrheit der Gesellschaft toleriert. Die Frage, wie das Lebensrecht des Menschen gegenüber dem des Tieres zu qualifizieren ist, sollte daher nicht im Zusammenhang mit der möglichen Rettung von Menschenleben durch Xenotransplantation diskutiert werden.

Auch ist eine hohe Akzeptanz bei Betroffenen, ihren Angehörigen sowie in der Bevölkerung, in Anbetracht einer möglichen Lebensrettung und Leidensverminderung, festzustellen. Die Frage, ob die Transplantation von xenogenen Material auf den Menschen die Schöpfungsordnung durchbricht oder ob Identitätsprobleme aufgeworfen werden könnten, spielt wohl primär in den Überlegungen von Theologen, Ethikern und Philosophen, jedoch weniger bei den Betroffenen und deren Angehörigen eine Rolle.

Natürlich muss die Entscheidung des potentiellen Rezipienten, eine mögliche Xenotransplantation nicht zu nutzen, in jedem Fall respektiert werden.

I.1.6 Lentiviren

Lentiviren sind deutlich komplexer aufgebaut als die meisten anderen Mitglieder der Familie der Retroviridae. Bekannteste Vertreter sind die humanen Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2. Verwandte Lentiviren sind aber auch bei Affen (SIV), Katzen (FIV) oder Rindern (BIV) bekannt. Aufgrund der weltweiten Ausbreitung und der großen, stetig steigenden Zahl der Erkrankten, sind die HI-Viren von besonderem wissenschaftlichen Interesse und daher auch Gegenstand der Untersuchungen in dieser Arbeit.

I.1.6.1 Das humane Immundefizienzvirus, HIV

Das mit einer HIV-Infektion assoziierte Krankheitsbild wurde erstmals um 1980 in den USA beobachtet. Es ist durch das Auftreten opportunistischer Infektionen und seltener maligner Tumore gekennzeichnet, ausgelöst durch eine ausgeprägte Schwächung des Immunsystems.

Inzwischen gilt es als gesichert, dass HIV-1 und HIV-2 das Ergebnis von Transspeziesübertragungen simianer Lentiviren ist. Für HIV-1 konnte das simiane Immundefizienzvirus der Schimpansen (SIVcpz), für HIV-2 das der rauchgrauen Mangabe (SIVsm) als Ursprungsvirus identifiziert werden. Diese Viren sind in ihren natürlichen Wirten apathogen, können jedoch in anderen Spezies AIDS auslösen. Die Mechanismen, die der Apathogenität der Viren im natürlichen Wirt zugrunde liegen, sind noch nicht vollständig verstanden, könnten jedoch hilfreich für die Entwicklung antiretroviraler Therapien sein.

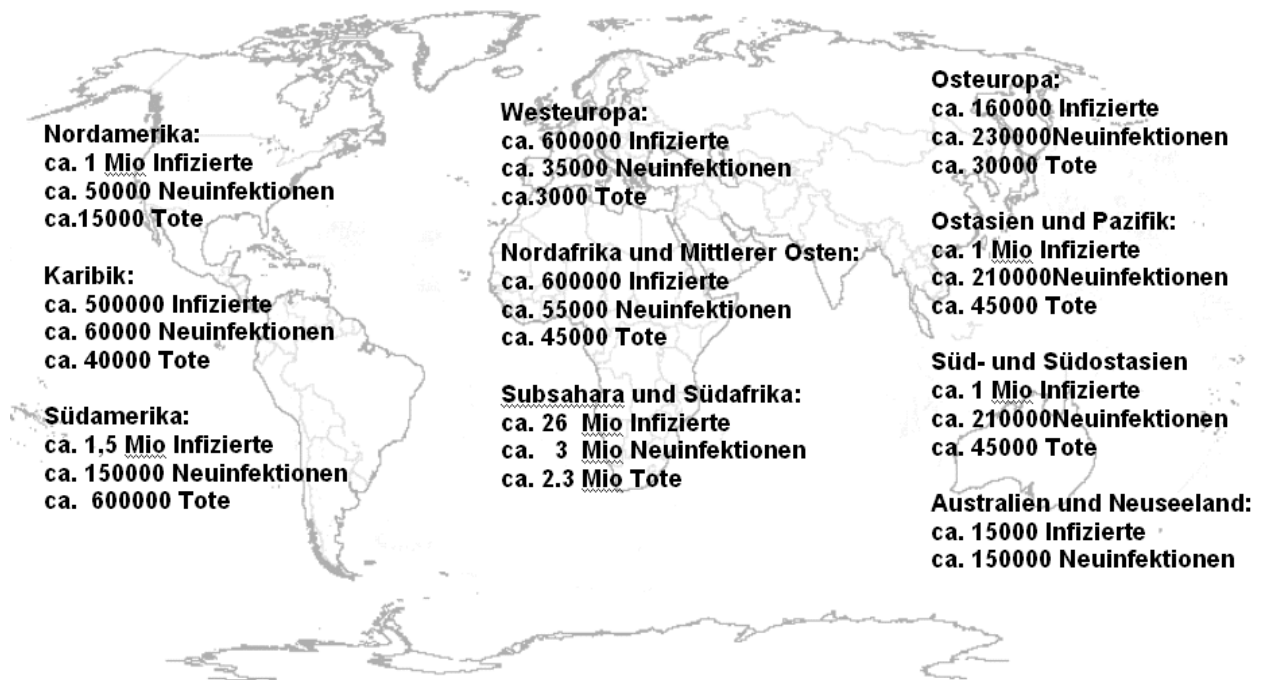


Abb. I.7: Globale Ausbreitung der HIV-1 Epidimie:

Am stärksten betroffen ist die Bevölkerung in den Gebieten der Subsahara und Südafrika (ca. 9% der Bevölkerung infiziert) und Asien (Quelle: UNAIDS, 2003)

Aufgrund der Sequenzunterschiede wird HIV-1 in drei Subtypen M (*major*), O (*outlier*) und N (*new*) eingeteilt. Der Subtyp M wird weiter in die Genotypen (*clades*) A bis I unterteilt. Die Verbreitung bestimmter Subtypen bzw. der Genotypen kann regional sehr unterschiedlich sein. In Westeuropa und den USA sind der Genotyp B, in der Subsahara und Südafrika der Genotyp C des HIV-1-Subtyps M die am weitesten verbreiteten Virusvarianten.

1986 wurde in Westafrika erstmals eine neue Virusvariante, HIV-2, isoliert. Derzeit sind sechs Genotypen (A-F), die vermutlich unabhängig voneinander entstanden sind, bekannt. Die HIV-2-Infektion hat sich nicht so rasant wie die HIV-1-Infektion ausgebreitet und blieb anfänglich vor allem auf Westafrika beschränkt. Heute hat auch HIV-2 die Kontinentgrenzen überschritten und ist in vielen anderen Regionen, besonders in Indien, nachzuweisen.

I.1.6.2 Pathogenese der HIV-Infektion

Das HI-Virus kann über Verletzungen der Schleimhaut, durch Samen- oder Vaginalflüssigkeit, beim Stillen durch infizierte Frauen oder direkten Blut-Blutkontakt übertragen werden. Die Infektion verläuft in drei Phasen: der Primärinfektion, inapparent oder mit leichten, grippeähnlichen Symptomen; dem symptomfreien Latenzstadium, in dem nur wenig Virus im

peripheren Blut des Infizierten nachgewiesen werden kann und der klinischen Phase, mit der Ausprägung einer akuten Immundefizienz. Die Mechanismen, mit denen HIV eine Immundefizienz hervorruft, sind noch nicht vollständig aufgeklärt.

Das symptomfreie Stadium ist von einem Gleichgewicht zwischen Virusreplikation und Immunabwehr gekennzeichnet. Die Zerstörung CD4-positiver Zellen hält sich mit der Regeneration die Waage. Aufgrund hoher Mutationsraten und des stetigen Selektionsdrucks durch die humorale und zelluläre Immunantwort, werden permanent neue Virusvarianten gebildet. Mit der Ausbildung von resistenten Virusvarianten verändern sich die Replikationseigenschaften und der Zelltropismus der Viren. Während am Anfang der Infektion hauptsächlich langsam replizierende, makrophagotrophe Viren nachgewiesen werden können, findet man in der symptomatischen Phase bevorzugt schnellreplizierende lymphotrope Varianten. Der Infektionsverlauf ist mit einem langsamen Abfall der CD4⁺- und der naiven CD8⁺-Lymphozyten und letztlich mit dem Zusammenbruch des Immunsystems und der Ausbildung der klinischen AIDS-Symptome verbunden.

Bei einigen Virusvarianten (z.B. HIV-1 IIIB) kann in Zellkulturen die Bildung von Syncytien und die Lyse infizierter Zellen beobachtet werden. Da aber nur wenige Zellen im Patienten infiziert sind, werden als Ursache für die Abnahme dieser Zellen indirekte Mechanismen wie Apoptose, Lyse durch zytotoxische T-Zellen oder die Hemmung der Neubildung aus Vorläuferzellen angenommen.

1.1.6.3 Die antiretrovirale Therapie

In den letzten Jahren konnte die antiretrovirale Therapie deutlich verbessert werden. Derzeit stehen zur Therapie HIV-infizierter Patienten verschiedene Therapeutika zur Verfügung, die zur klinischen Behandlung der Patienten miteinander kombiniert werden. Sie lassen sich in verschiedene Wirkstoffgruppen einteilen (Tab. I.4).

Steht den Patienten eine optimale medizinische Versorgung zur Verfügung, kann durch eine hoch aktive antiretrovirale Therapie (HAART) die asymptomatische Phase der HIV-Infektion über Jahre verlängert werden. Um Resistenzbildungen möglichst lange zu verzögern, wird bei der HAART eine Kombination aus nukleosidischen, nichtnukleosidischen RT-Hemmern und Proteaseinhibitoren eingesetzt.

Tab. I.4: HIV-Therapeutika in klinischer Anwendung.

Wirkstoffgruppe	Wirkmechanismus	Substanz
nukleosidische Hemmer der RT	Substrat der RT, bewirkt einen Kettenabbruch während der reversen Transkription	Nukleosidanaloga, z.B. Azidothymidin, AZT
nichtnukleosidische Hemmer der RT	spezifische Hemmung der RT durch allosterische Bindung im katalytischen Zentrum	Dipyridodiazepin-Derivate z.B. Viramune (Nevirapin)
Proteaseinhibitoren	Hemmung der viralen Protease, Bildung unreifer, nicht infektiöser Viruspartikel	Substrate der Protease, z.B. Indinavir
Fusionshemmer	Hemmung der Zusammenlagerung der Helixregionen (NHR/CHR) des gp41, Inhibition des Viruseintritts in die Zielzelle	Polypeptide, z.B. T20

Obwohl durch die HAAR-Therapie die Viruskonzentration im peripheren Blut bis unter die Nachweisgrenze gesenkt werden kann, erfolgt keine Eliminierung der Proviren aus den Zellen des Organismus und damit keine Heilung. Das Virus verfügt im Organismus über Reservoirs, die durch die HAART nicht getroffen werden. Das Auftreten resistenter Viren während der Therapie führt daher langfristig zum Therapieversagen.

Seit dem Jahr 2003 ist ein weiterer antiviraler Hemmstoff als HIV-Therapeutikum zugelassen. Das 38 Aminosäurereste lange Peptid, T20, ist von der CHR-Domäne des gp41 abgeleitet und hemmt durch Anlagerung an die NHR-Domäne des viralen gp41 den Fusionsprozess (Wild et al. 1995). Nach längerer Anwendung wurde jedoch auch hier die Bildung resistenter Virusstämme beobachtet. T20 wird in Kombination mit anderen Hemmstoffen eingesetzt. Die jährlichen Kosten dieser Therapie betragen ca. 25000 US\$ (James, 2003).

Ein weiterer, noch im klinischen Test befindlicher Ansatz, ist die passive Immunisierung HIV-Infizierter mit einer Kombination aus den breitneutralisierenden Antikörper 2F5, 4E10 und 2G12 (Tab. I.5). Durch die Applikation großer Mengen gereinigter, monoklonaler Antikörper, konnte die Viruslast im peripheren Blut deutlich gesenkt werden (Stiegler et al., 2002). Eine Klärung des Virus aus dem Organismus kann auch mit dieser Therapie nicht erreicht werden. Auch hier dürften die hohen Kosten der Therapie einer breiten klinischen Anwendung entgegenstehen. Alle derzeit in klinischer Anwendung oder Erprobung befindlichen Therapieansätze haben die Bildung resistenter Virusstämme gemeinsam, die früher oder später zum Therapieversagen und zur Entwicklung von AIDS führen.

I.1.6.4 Neutralisierende monoklonale Antikörper gegen HIV-1

Die Induktion von Antikörpern mit einem breiten Neutralisationsspektrum scheint derzeit als ein möglicher Ansatz zu einer effektiven HIV-Prophylaxe. Verschiedene solcher Antikörper konnten in den letzten Jahren aus infizierten Patienten isoliert werden (Tab. I.5)

Die Ergebnisse der klinischen Studien zur passiven Immunisierung bei infizierten Patienten bestätigen das hohe Potential solcher neutralisierenden Antikörper. Durch die passive Immunisierung mit einer Kombination der monoklonalen Antikörper 2G12, 4E10 und 2F5 konnte die Viruslast im peripheren Blut der Patienten bis unter die Nachweisgrenze gesenkt werden (Stiegler et al., 2002; Wolbank et al., 2003).

Tab. I.5: Neutralisierende monoklonale Antikörper gegen HIV-1 Hüllproteine

Antikörper	Bindungsstelle/Bemerkungen	Literatur
2G12:	Das Epitop liegt in der C4/V4 Region von gp120. Für die Bindung sind die Manosereste N295, N332 und N392 essentiell. Aufgrund von Mutationen weist 2G12 nicht, die für IgG1 Antikörper übliche Struktur auf. Die Erkennung des Antigens erfolgt nicht durch die variable Region des Antikörpers, sondern durch variable Teile der schweren Ketten. Die Bindung des Antigens weist Analogien zur Zucker-Lektinbindung auf, was für Antikörper-Antigen-Bindungen untypisch und selten ist. 2G12 zeigt ein breites Neutralisationsspektrum gegen HIV-1-Primärisolate und wird daher erfolgreich zur passiven Immunisierung in klinischer Phase I eingesetzt (in Kombination mit 2F5).	Trkola et al., 1995 Scanlan et al., 2002 Stiegler et al., 2002 Calarese et al., 2003
1b12:	Das Epitop überlappt mit der CD4-Rezeptorbindungsstelle des gp120, daraus resultiert eine kompetitive Hemmung der Rezeptorbindung. Die Anlagerung des Virus an die Zielzelle wird verhindert. Durch 1b12 werden Isolate der Subtypen D und E sowie einige Isolate der Subtypen A, B, C und F neutralisiert.	Burton et al., 1994
17b:	Das Epitop überlappt die Chemokinrezeptorbindungsstelle. Es wird erst durch die aus der gp120/CD4-Bindung resultierenden Konformationsänderungen freigelegt. 17b zeigt ein breites Neutralisationsspektrum gegen Primärisolate der Subtypen A, B, C, D, E, F und G.	Thali et al., 1993 Moulard et al., 2002
2F5:	Das 2F5-Epitop liegt im membranproximalen Bereich der Ektodomäne des Transmembranproteins, am Ende der CHR-Helix (Kernsequenz: LDKW). In zahlreichen Versuchen mit Peptidvakzinen, rekombinanten Proteinkonstrukten oder rekombinanten Viren, die als Träger der ELDKWA-Sequenz dienten, konnten lediglich bindende Antikörper, jedoch keine neutralisierenden induziert werden. 2F5 zeigt ein subtypübergreifendes Neutralisationsspektrum innerhalb der Gruppe M und wurde erfolgreich in klinischen Studien zum passiven Immuntransfer eingesetzt.	Muster et al., 1993 McGaughey et al., 2003

Antikörper	Bindungsstelle/Bemerkungen	Literatur
4E10:	Das 4E10-Epitop liegt im membranproximalen Bereich der gp41-Ektodomäne, in direkter Nachbarschaft zum 2F5-Epitop (drei Aminosäurereste weiter C-terminal). 4E10 erkennt die Sequenz NWFN/DIT. Wie 2F5 wurde 4E10 aus einem HIV-positiven Patienten isoliert und neutralisiert verschiedene Subtypen von HIV-1-Primärisolaten der Gruppe M. Wie 2F5 wurde 4E10 in Kombination mit anderen neutralisierenden Antikörpern erfolgreich in klinischen Studien zum passiven Immuntransfer eingesetzt.	Zwick et al., 2001; Stiegler et al., 2003; Kitabwalla et al., 2003; Ruprecht et al., 2003

Alle bekannten breit neutralisierenden Antikörper wurden aus HIV-infizierten Patienten isoliert. Trotz zahlreicher Versuche in Tiermodellen und klinischen Studien ist es bisher jedoch noch nicht gelungen, eine gegen unterschiedliche Subtypen gerichtete schützende Immunantwort im Patienten zu induzieren. Die genaue Aufklärung des Wirkmechanismus dieser Antikörper könnte wichtige Hinweise auf die Beschaffenheit geeigneter Antigene geben.

I.1.7 Pathogenes Potential von Retroviren

In der Veterinärmedizin ist das pathogene Potential der Retroviren seit langem bekannt. In den letzten drei Jahrzehnten konnten auch humanpathogene Retroviren identifiziert und mit bestimmten Krankheiten assoziiert werden. Während Retroviren in ihrem natürlichen Wirt häufig apathogen sind (z.B. SIV), können sie nach einer Transspeziesübertragung zu tödlichen Erkrankungen im neuen Organismus führen.

Die krankheitsauslösenden Mechanismen können sehr unterschiedlich sein. Am häufigsten kommt es durch die Integration des Provirus in das zelluläre Genom des Wirtsorganismus zur Inaktivierung essentieller Gene oder zu einer veränderten Regulation durch die viralen LTR-Elemente. Kommt es dadurch zu einer Aktivierung von Protoonkogenen oder zur Schädigung von Tumorsuppressorgenen, kann das zur Tumorentwicklung führen. Zusätzlich können Retroviren Onkogene tragen, deren Genprodukte in die Regulationsmechanismen infizierter Zellen eingreifen und so eine Tumorbildung auslösen.

Des Weiteren kann eine Infektion durch Retroviren zur Ausprägung einer Immunsuppression und damit zur Immunschwäche führen. Dafür verantwortlich sind vermutlich konservierte Domänen innerhalb der Hüllproteine, besonders innerhalb der Transmembranhüllproteine. So konnte z.B. für das murine Leukämievirus (MuLV) oder das humane Immunschwächevirus (HIV) gezeigt werden, dass deren Transmembranhüllproteine p15E bzw. gp41 in der Lage sind, die Lymphozytenproliferation zu hemmen und eine umfangreiche Modulation der

Zytokinexpression zu bewirken. Auch wenn der genaue Mechanismus, wie Retroviren Immunsuppression auslösen noch unklar ist, zeigt das Beispiel der HIV-Infektion, zu welchen fatalen Folgen eine Infektion führen kann.

I.2 Zielsetzung der Arbeit

Heute gilt es als allgemein anerkannt, dass der Ausbruch der AIDS-Epidemie auf eine Zoonose von SIV auf den Menschen zurückzuführen ist. Welche Gefahren durch Zoonosen entstehen können, zeigt auch als jüngstes Beispiel die SARS-Epidemie. Das von Zibetkatzen auf den Menschen übertragende Coronavirus löst eine schwere Infektion der Atemwege aus, die im Jahr 2003 bei ca. 800 Menschen zum Tode führte.

Auch die Übertragung von PERV auf Xenotransplantatempfänger könnte fatale Folgen haben. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Transmembranhüllproteine der Gammaretroviren, ähnlich wie das Transmembranhüllprotein von HIV, Zytokinmodulation hervorrufen können. Eine dadurch ausgelöste Immunsuppression könnte zu einem ähnlichen Krankheitsbild wie während einer HIV-Infektion führen.

In dieser Arbeit sollte ein effektives Antigen entwickelt werden, das geeignet ist, mögliche Transplantatempfänger durch eine präventive Vakzinierung vor einer möglichen Infektion durch PERVs zu schützen. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Induktion eines Impfschutzes gegen verwandte Gammaretroviren (FeLV und MuLV) durch Immunisierung mit dem Oberflächenprotein (gp70) möglich ist. Alle in Deutschland derzeit zugelassenen FeLV-Impfstoffe, basieren auf dem Oberflächenprotein gp70. Keiner dieser Impfstoffe zeigt jedoch eine 100%ige Effektivität und von den Herstellern wird eine jährliche Auffrischungsimpfung empfohlen. Die Induktion neutralisierender Antikörper gegen das TM-Protein der Gammaretroviren ist für FeLV und MuLV beschrieben worden, hat aber bei der Entwicklung effektiverer Impfstoffe bislang keine Beachtung gefunden. In dieser Arbeit wurde daher als Basis für einen PERV-Impfstoff das unglykosylierte, weniger sequenzvariable Transmembranprotein gewählt. Die Eignung eines rekombinant generierten PERV-p15 zur Induktion einer neutralisierenden Immunantwort sollte untersucht werden. Die Reproduzierbarkeit und statistische Absicherung der Daten sollte in unterschiedliche Spezies erfolgen.

Die Charakterisierung der induzierten Antikörper soll wichtige Hinweise auf den Bindungs- und Neutralisationsmechanismus neutralisierender Antikörper gegen Hüllproteine anderer

Retroviren, besonders HIV-1 geben. Durch diese Daten sollte die Grundlage für die Entwicklung geeigneter Peptidantigene gelegt werden.

Zirka 20 Jahre nach der Identifizierung des HI-Virus als Ursache der tödlichen Immunschwächekrankheit AIDS, steht weder eine virusklärende Therapie noch ein effektives prophylaktisches Vakzin zur Verfügung. Alle bisherigen Versuche zur Entwicklung eines Impfstoffes schlugen fehl. Die genaue Untersuchung des Bindungs- und Neutralisationsmechanismus neutralisierender Antikörper, die aus infizierten Patienten isoliert wurden, könnte ein wichtiger Beitrag zum Design geeigneter Antigene sein.

In dieser Arbeit sollte der monoklonale Antikörper 2F5 durch Bindungsstudien und *in vivo*-Neutralisationsassays charakterisiert werden. 2F5 bindet an ein hochkonserviertes Epitop im membranproximalen Bereich der gp41-Ektodomäne des HIV-1 und wurde erfolgreich in Studien zum passiven Immuntransfer eingesetzt. Zahlreiche fehlgeschlagene Versuche zur Induktion neutralisierender Antikörper gegen diese Region weisen auf eine weitaus komplexere Beschaffenheit des Epitops hin, als bisher bekannt. Auf der Grundlage der Untersuchungen des Bindungs- und Neutralisationsmechanismus von 2F5 und PERV-neutralisierender Antikörpern, sollten neue rekombinante und synthetische Antigene entwickelt und in Immunisierungsstudien eingesetzt werden.

II Material und Methoden

II.1 Materialien und Bezugsquellen

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von Sigma-Aldrich (Taufenkirchen, Deutschland) bezogen.

II.2 Sterilisation von Materialien

Hitzestabile Lösungen und Labormaterialien wurden 20min bei 1,2bar und 121°C autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden über Membranfilter (0,2µm) sterilfiltriert.

II.3 Verwendete Antikörper

Antikörper	Gebrauchslösung	Bezugsquelle
mAb 2F5 HIV-1-gp41- spezifischer, monoklonaler Antikörper (human)	ELISA: 0,2µg/ml in PBS/0,05% Tween20 WB: 0,5µg/ml in PBS/0,05% Tween20	AIDS Research & Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAD, NIH. Dr. H. Katinger (Purtscher et al., 1994, 1996).
Ziege-anti-Human- Serum (POD-Konjugat)	ELISA: 1:2000 in PBS/0,05% Tween20 WB: 1:2000 in PBS/0,05% Tween20	Sigma-Aldrich (Deutschland)
Ziege-anti-Ratte-Serum (POD-Konjugat)	ELISA: 1:2000 in PBS/0,05% Tween20 WB: 1:2000 in PBS/0,05% Tween20	Sigma-Aldrich (Deutschland)
Kaninchen-anti-Ratte- IgG (POD-Konjugat)	ELISA: 1:2000 in PBS/0,05% Tween20 WB: 1:2000 in PBS/0,05% Tween20	Sigma-Aldrich (Deutschland)
Kaninchen-anti-Ratte (POD-Konjugat)	Epitopmapping: 1:10000 in PBS/0,05% Tween20	DAKO (Großbritannien)
Kaninchen-anti-Ziege (POD-Konjugat)	Epitopmapping: 1:10000 in PBS/0,05% Tween20	DAKO (Großbritannien)
Kaninchen-anti-human (POD-Konjugat)	Epitopmapping: 1:10000 in PBS/0,05% Tween20	DAKO (Großbritannien)
Kaninchen-anti-Ziege- IgG-Fc (FITC-Konjugat)	FACS-Analyse: 0,5µg/ml in PBS/10%FKS	Sigma-Aldrich (Deutschland)

II.4 Peptide

Die verwendeten Peptide wurden von der Firma Jerini Biotoools GmbH (Berlin, Deutschland) synthetisiert. Die Peptidsets wurden vom NIH (*National Institutes of Health, AIDS Research and Reference Reagent Program*) zur Verfügung gestellt.

Peptid	Aminosäuresequenz
PERV-E1	ALITGPQQLEKGLSC
PERV-E2	CREADQGWFEQWFNR
PERV-E1-Cys	AALITGPQQLEKGLSNLHRICKKK
PERV-E2-Cys	KKKCCREREADQGWFEQWFNRSPWM
PERV-ISU	LQNRRLDLLFLKEGGLC
HIV-E1	LGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLSC
HIV-E2	CNEQELLELDKWASLWNWFDITNWL
DP178	YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF (Wild et al., 1994)
HIV-ISU	KQLQARILAVERYLKDQQL
6342-Mut1	AAAATLTVQARLLLS
6342-Mut2	AASVAATVQARLLLS
6342-Mut3	AASVTLAAQARLLLS
6342-Mut4	AASVTLTVAAARLLLS
6342-Mut5	AASVTLTVQAAALLS

Peptidset	Katalognummer
HIV-1 MN Env (15-mer) Peptide, Komplettsset	NIH-6451
HIV-1 HXB2 GAG (15-mer) Peptide, Komplettsset	NIH-5107

II.5 Primer und Sonden

Die für diese Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer) zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR wurden von der Firma Sigma-Genosys (Steinheim, Deutschland) hergestellt und HPLC-gereinigt.

Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide (Sonden) zur Quantifizierung der Provirusintegration mittels *Realtime*-PCR wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) synthetisiert. Als Donorfluorophor wurde am 5'-Ende FAM (6-Carboxyfluorescein), als Akzeptorfluorophor am 3'-Ende DDQ (Dabcyl- Dark Quencher) gekoppelt.

Die Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden sind im Folgenden aufgeführt:

HIV-Realtime-PCR:

(Cassols et al. 1991)

157-160

For: 5'GGARCAGCIGGAAGCACIATGG (SK68i)
Rev: 5'CCCCAGACIGTGAGITICAACA (SK69i)
Sonde: 5'- 6Fam-TGACGCTGACGGTACAGGCCAGAC-DDQ

HIV-Pol-PCR:

For: 5'TCTTAGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGG
Rev: 5'AACGACAAAGGTGAGTATCCCTGCCTAA

HIV-gp41 Klonierung:

For: 5'CGGGATCCGGAGCATCAGTAACGCTGACGGTACAAGCGAGACAGCTGCTGAGTGATATTG
Rev: 5'CGCTCGAGCTAATACCACAGCCAATTTGTTATGTTGAACCAGTTCCAAAGCGACGCCCA

PERV-Realtime-PCR:

For: 5'TCCAGGGCTCATAATTTGTC
Rev: 5'TGATGGCCATCCAACATCGA
Sonde: 5'- 6Fam-AGAAGGGACCTTGGCAGACTTTCT-DDQ

PERV-Pol-PCR:

For: 5'GTA CGT ACG TGG ATC CCT AAT CAC AGG ACC GCA ACA
Rev: 5'ACG TAC GTA CGA ATT CTC AGT TGA ACC ATC CTT AAA ACC

PERVp15E Klonierung:

For: 5'GTA CGT ACG TGG ATC CCT AAT CAC AGG ACC GCA ACA
Rev: 5'ACG TAC GTA CGA ATT CTC AGT TGA ACC ATC CTT AAA ACC A
T7 prom: 5'TAATACGACTCACTATAGGG
T7 term: 5'TTATAGCAAAATCCTTTC

II.6 Bakterienstämme und Expressionsplasmide

Für die Durchführung gentechnischer Arbeiten (Klonierung, Expression von Proteinen und Mutagenese) wurden die kommerziell erhältlichen *Escherichia coli* Stämme Top10 und BL21-CodonPlus verwendet.

Bakterien:

Top10 F'(Stratagene, Amsterdam, Niederlande): *E. coli* (*F'*(*lacIq*, *Tn10*(*TetR*)) *mcrA* Δ (*mrrhsdRMS-mcrBC*) Φ 80 *lacZ* Δ *m15* Δ *lacX74* *deoR* *recA1* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL*(*StrR*) *endA1nupG*)

BL21-CodonPlus(DE3)-RP (Stratagene, Amsterdam, Niederlande): *E. coli* B F-ompThsdS (rB- mB) dcm+ Tetr gal λ (DE3) endA Hte [argU proL Camr]

Plasmide:

Zur IPTG-induzierten Expression rekombinanter Proteine wurde der pCal-n-Flag-Vektor der Firma Stratagene verwendet (#204302; Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Das Expressionsprodukt ist mit einem Fusionsprotein (*calmodulin binding peptide*, CBP) versehen, über das eine Affinitätschromatographische Isolation ermöglicht wird. CBP kann durch proteolytischen Verdau mit Thrombin vom Zielprotein abgespalten werden.

Der pCal-n-Flag-Vektor ist mit einem Markergen ausgestattet, welches die Ampicillinresistenz (Amp^R) codiert und die Selektion von positiven Transformanten ermöglicht.

II.7 Kultivierung von *E. coli*

Die Bakterienzellen wurden auf Luria-Bertani-Agarplatten bzw. als Schüttelkultur in Luria-Bertani-Medium bei 37°C/225rpm kultiviert. Zur Selektion plasmidtragender Transformanten wurde ein entsprechendes Antibiotikum zugegeben (Ampicillin 100µg/ml). Im Folgenden wird Luria-Bertani mit LB und Ampicillin mit Amp abgekürzt.

II.8 Verwendete Nährmedien

Zur Kultivierung der Mikroorganismen wurden LB-Medium bzw. LB-Agar-Platten, gegebenenfalls unter Zugabe eines entsprechenden Selektionsantibiotikums eingesetzt.

LB-Medium: (pH 7,5)	Trypton	1,0 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	NaCl	0,5 % (w/v)
LB Agarplatten:	Trypton	1,0 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	NaCl	0,5 % (w/v)
	Agar-Agar	1,2 % (w/v)

Das Medium wurde autoklaviert, die LB-Platten unter sterilen Bedingungen gegossen und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Um Ampicillin-Stammlösungen herzustellen, wurden 100mg/ml Ampicillin in bidestilierten Wasser gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und lichtgeschützt bei –20 °C gelagert.

II.9 Transformation von Bakterien

Durch Transformation kann Plasmid-DNA in elektro- oder chemokompetente Bakterienzellen eingebracht werden (Cohen et al., 1972). In dieser Arbeit wurden ausschließlich chemokompetente Zellen verwendet.

Um chemokompetente Zellen herzustellen, wurden die Bakterien aus der logarithmischen Wachstumsphase einer Behandlung mit speziellen Transformationspuffern unterzogen. Der hohe Gehalt an Calcium-Ionen (Ca^{2+}) in diesen Puffern führt dazu, dass die bakterielle Plasmamembran für fremde DNA durchlässig wird (Darnel et al., 1994).

Die Herstellung chemokompetenter Bakterien erfolgte nach den Angaben im QIAexpressionist (Qiagen, 3.Auflage, 1997, S.30). Die Zellsuspension wurde in 1,5ml Reaktionsgefäße aliquotiert (je 200µl). Die Lagerung der in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Aliquote erfolgte bei –80°C.

Zur Übertragung der DNA wurde ein Aliquot chemokompetenter Bakterienzellen auf Eis aufgetaut, vorsichtig resuspendiert und 95µl der Zellsuspension mit 5µl des

Ligierungsansatzes vermischt. Der Ansatz wurde 30min auf Eis inkubiert und anschließend bei 42°C für 90s einem Hitzeschock ausgesetzt. Anschließend wurde für weitere 3min auf Eis inkubiert, 500µl LB-Medium zugegeben und für 45min bei 37°C geschüttelt. Die Zellsuspension wurde 3min bei 3000xg zentrifugiert, der Überstand dekantiert, die Zellen mit dem verbliebenen Medium resuspendiert und auf LB+Amp Platten ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht bebrütet.

II.10 Vorkulturen

Für eine Vorkultur wurden 6ml LB+Amp mit einer Bakterienkolonie oder 4µl einer Glycerindauerkultur angeimpft und bei 37°C in einem Inkubationsschüttler bei 37°C über Nacht geschüttelt.

II.11 Glycerindauerkulturen

Um *E. coli*-Stämme bzw. Bakterienzellen eines Klonen zu konservieren, wurden Glycerindauerkulturen angelegt. Dafür wurden in einem 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäß 450µl einer Vorkultur mit 900µl Glycerin vermischt und bei -20°C gelagert.

II.12 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

II.12.1 IPTG-induzierte Expression

Das in den pCal-n-Vektor eingebrachte Gen des Zielproteins steht unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors, der die gezielte Transkription eingefügter Sequenzen durch die Zugabe von Isopropylthiogalaktopyranosid (IPTG) erlaubt. IPTG ist ein nicht metabolisierbarer Induktor, der durch die Bindung an den Repressor die Transkription der *lac*-Strukturgene und damit auch des eingeführten Inserts ermöglicht.

Die Expression erfolgte in dem *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus(DE3). Dazu wurde in 500ml vorgewärmtes LB+Amp-Medium (37°C) 1ml einer frischen Vorkultur (siehe 2.10.) überführt und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe 1mM IPTG (Endkonzentration) bei einer optischen Dichte(OD) von 0,5 bei 550nm induziert. Die Expressionskultur wurde weitere 3h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien bei 6000xg pelletiert und der Überstand wurde dekantiert. Das Bakterienpellet wurde bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

II.12.2 Aufschluss der Bakterien

Zum Aufschluss der relativ stabilen *E.coli*-Zellwände wurde das Zellsediment in 30ml Lysepuffer (50mM Tris, 150mM NaCl, 10mM 2-Mercaptoethanol, 1mM Mg-acetat, 1mM Imidazol, 2mM CaCl₂/ pH8) fein resuspendiert, 30mg Lysozym wurden zugegeben und 30min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterienzellen durch fünf Ultraschallimpulse à 30s endgültig lysiert. Um eine zu starke Erwärmung zu vermeiden, wurde die Suspension zwischen den Ultraschallimpulsen auf Eis gekühlt. Die Zelltrümmer wurden 20min bei 10⁴xg / 4°C sedimentiert. Im Überstand gelöste Expressionsprodukte (CBP-Fusionsproteine) wurden anschließend durch Calmodulin-Affinitätschromatographie extrahiert.

Besonders Transmembranhüllproteine der Retroviren sind stark hydrophob und daher in wässriger Umgebung häufig unlöslich. Bakterien bilden aus solchen Proteinen unlösliche Einschlüsse (*Inclusion Bodies*), die sich im Zytoplasma ablagern. Solche Ablagerungen sedimentieren nach dem Aufschluss der Bakterien zusammen mit anderen Zelltrümmern. Eine affinitätschromatographische Isolation von *Inclusion Bodies* ist über eine CBP-Affinitätschromatographie nicht möglich. Die Anreicherung solcher Proteine erfolgte durch Abtrennung der löslichen Fraktionen und Acetonfällung (siehe 2.12.3.).

II.12.3 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Die Extraktion des löslichen, rekombinant exprimierten CBP-rp15E aus dem *E.coli*-Zelllysat erfolgte durch Calmodulin-Affinitätschromatographie. Diese Methode basiert auf der Bindung des mit dem Zielprotein fusionierten Calmodulinbindepoteins (CBP) an eine Calmodulin-Affinitätsmatrix (*Calmodulin Affinity Resin*). Durch Zugabe von EGTA kann die CBP-Calmodulinbindung gelöst und das Zielprotein eluiert werden. Es wurde das Affinity LIC Cloning and Protein Purification Kit (#214405) der Firma Stratagene (Amsterdam, Niederlande) verwendet.

Das Lysat von 250ml einer IPTG-induzierten Kultur wurde 16h bei Raumtemperatur über 7,5ml des Säulenmaterials rezirkuliert (Flußrate 1,5ml/min). Das Waschen des Säulenmaterials sowie die Elution des gebundenen Proteins erfolgte nach Herstellerprotokoll.

Unlösliche Expressionsprodukte können durch diese Methode nicht isoliert werden, da die Interaktion des Calmodulins mit seinem natürlichen Liganden (CBP) physiologische Pufferbedingungen erfordert. Liegt das Zielprotein in unlöslich *Inclusion Bodies* wären z.B. eine Metallchelatchromatographie unter 8M Harnstoff oder 6M Guanidinhydrochlorid (Ni-NTA-Chromatographie), Gelchromatographie oder HPLC-Reinigung möglich. Alle genannten

Methoden erfordern jedoch einen hohen arbeitstechnischen und finanziellen Aufwand. Eine grobe, aber weniger aufwändige Abtrennung unerwünschter Proteine und Zellbestandteile kann durch mehrmaliges intensives Auswaschen des Pellets mit PBS und der Fällung der verbliebenen Proteine durch eiskaltes Aceton erreicht werden. Dazu wurde das nach der Lyse unlösliche Sediment in 150ml PBS aufgenommen, fein resuspendiert und für 30min bei RT in einen Überkopfschüttler inkubiert, anschließend wurde die Suspension erneut pelletiert (15000xg/15min). Der Vorgang wurde so oft wiederholt, bis im Überstand kein Protein mehr nachweisbar war. Das Pellet wurde in 20ml eiskaltem Aceton (-20°C) fein resuspendiert und erneut pelletiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und dann auf einer Glasplatte fein zu einem Puder zerrieben.

II.13 Molekularbiologische Methoden

II.13.1 Plasmid-Präparation aus *Escherichia coli*

Für eine Plasmid-Präparation wurden 1,5ml einer Vorkultur bei 10^4 xg sedimentiert, der Überstand dekantiert und die Zellen unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben bearbeitet. Die Plasmid-DNA wurde mit 50µl Wasser (bidest.) eluiert.

II.13.2 Reinigung von DNA-Fragmenten

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten wurden zwei verschiedene Verfahren eingesetzt:

- Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen
Dieses Verfahren wurde zur Trennung und Isolierung von spezifischen DNA-Fragmenten bestimmter Größe, z.B. nach Restriktion oder zur Trennung zirkulärer von linearer DNA angewandt. Die Isolierung der DNA aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits der Firma QIAGEN gemäß den Herstellerangaben.
- Isolation und Reinigung der DNA aus Reaktionsgemischen
Zur Abtrennung von Salzen, Enzymen, Proteinen und einzelner Nukleotide sowie zur Volumeneinengung bis auf 30µl, wie z.B. nach einer PCR oder Ligation, wurde der PCR Purifikation Kit der Firma QIAGEN eingesetzt. Die Reinigung erfolgte nach Herstellerangaben.

II.13.3 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA aus Zelllysat, Gewebe oder Vollblut erfolgte unter Verwendung eines kommerziellen Kits nach Angaben des Herstellers (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland).

II.13.4 Agarosegel-Elektrophorese

Die Trennung von DNA-Fragmenten nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau erfolgte nach ihrem Molekulargewicht mittels horizontaler Flachgel-Elektrophorese (Sambrooke et al., 1989), die zur Identifizierung und Reinigung eingesetzt wurde. Je nach zu erwartender Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurde die Agarose-Konzentration zwischen 1 – 2 % variiert. Die Markierung der DNA erfolgte durch anschließende Inkubation in einem Ethidiumbromidbad. Das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid macht eine Visualisierung durch UV-Licht möglich (Walker et al., 1993). Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 5 -15 V/cm in einem TBE-Puffersystem. Dazu wurde die Probe mit ca. 1/10 (v/v) Ladungspuffer versetzt. Die ethidiumbromidgefärbten Banden wurden mittels UV-Licht ($\lambda=312\text{nm}$) in einem Gel-Dokumentationsgerät der Firma Biorad sichtbar gemacht und quantitativ ausgewertet. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes bzw. der Anzahl der Basenpaare linearer, doppelsträngiger DNA wurden kommerziell erhältliche DNA-Standards (Invitrogen, Leek, Niederlande) eingesetzt.

II.13.5 Restriktionsverdau

Die spezifische Hydrolyse doppelsträngiger DNA erfolgte durch die Spaltung der Phosphodiesterbrücken mittels Restriktionsendonucleasen. Dabei wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen gewählt. Die zur Spaltung eingesetzten Endonukleasekonzentrationen betrugen 2-5U/ μg DNA in einem Reaktionsvolumen von 30-50 μl . Die Inkubationszeit betrug 1-2 Stunden.

Um eine quantitative Hydrolyse der DNA zu erreichen, wurden 5-10U/ μg DNA eingesetzt. Dem Ansatz wurden nach einer Inkubationszeit von einer Stunde nochmals 5U/ μg DNA zugefügt. Es wurde eine weitere Stunde inkubiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen der Firma NEB (Frankfurt a.M., Deutschland) eingesetzt.

II.13.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten erfolgte durch eine T4-DNA-Ligase (5U/Ligationsansatz; NEB, Frankfurt a.M., Deutschland). Die Ligierung glatter Enden wurde bei 4°C und die kohäsiver Enden bei 16°C jeweils über Nacht durchgeführt.

In den Ligationsansätzen wurde das molare Verhältnis von Vektor zu Insert so gewählt, dass das Insert im deutlichen Überschuss (ca. 1:5) vorlag. Je Ansatz wurden ca. 100ng des Vektorfragmentes eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl.

Um die Rezirkularisierung linearisierter Vektorfragmente zu vermeiden, wurden die 5'-Enden des Vektormoleküles durch alkalische Phosphatase (SAP, NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) dephosphoryliert. Durch die T4-DNA-Ligase können dephosphorylierte Enden nicht durch die Bildung von Phosphordiesterbrücken kovalent verknüpft werden.

Zur Dephosphorylierung der 5'-Enden wurden ca. 1µg Vektorfragment mit 5U SAP eine Stunde in SAP-Puffer (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) bei 37°C inkubiert. Durch Erhitzen auf 65°C für 30min wurde das Enzym inaktiviert.

II.13.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist ein geeignetes *in vitro*-Verfahren zur selektiven Vermehrung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und Sequenz (Mullis et al., 1986). In dieser Arbeit wurde die PCR zur gezielten Amplifizierung (spezifischer Nachweis von Genfragmenten) und zellfreien Klonierung von DNA-Fragmenten verwendet. Die Reaktion wurde in 25 µl-Ansätzen in einem Perkin Elmer 2400 oder MJ Research PTC-200 Thermocycler durchgeführt.

Die geeignete Hybridisierungstemperatur (T_s) für die eingesetzten Primer wurde mittels folgender Gleichung bestimmt:

$$T_s = 69,3 + 0,41(\%GC) - 650 / N^{-1}$$

% GC = prozentualer Anteil von Guanin und Cytosin im Primer

N = Primerlänge in Basen

Allgemeiner PCR-Reaktionsansatz:

10-15ng	Plasmid-DNA (oder bis zu 300ng genomische DNA)
2,5µl	10x PCR-Puffer (Roche, Mannheim, Deutschland)
10-15pmol	Primer1 (Sigma-Genosys, Steinheim, Deutschland)
10-15pmol	Primer2 (Sigma-Genosys Steinheim, Deutschland)
10nmol	dNTP-Mix (Peqlab, Erlangen, Deutschland)
1-5U	Ampli-Taq-Gold DNA-Polymerase (Roche, Mannheim, Deutschland)
add 25µl ddH ₂ O	

II.13.8 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde zur Identifizierung positiver Transformanden (Kolonie-Screening, Walker et al., 1993) nach der Transformation von Bakterien mit Plasmiden eingesetzt. Sie stellt eine schnelle und kostengünstige Nachweismethode zur Überprüfung von vielen, klonalen Bakterienkolonien auf in Plasmide eingebrachte DNA-Fragmente dar. Dazu wurde die Bakterienkolonie von einer Transformationsplatte mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und kurz im vorbereiteten PCR-Reaktionsansatz abgestreift. Die anschließende PCR wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

II.13.9 *Realtime-PCR*

Zur Quantifizierung der Provirusintegration von PERV bzw. HIV in das Genom der Wirtszellen wurden *Realtime-PCR* Systeme nach dem Taqman-Prinzip etabliert. Diese Methode erlaubt die spezifische Quantifizierung des Amplifikats während der einzelnen Reaktionszyklen. Dabei wurden amplifikatspezifische, fluoreszenzmarkierte Sonden eingesetzt, die eine höhere Spezifität sowie eine gesteigerte Sensitivität im Vergleich zur klassischen SYBR-Green-Methode gewährleisten.

Als *Template* wurde Proteinase K behandeltes Zelllysat eingesetzt (2.16.4.). Die optimale Konzentration der Primer, Sonde, Magnesiumchlorid und des *Templates* wurde experimentell ermittelt.

Ein typischer Reaktionsansatz ist im Folgenden aufgeführt:

2µl	Template
2,3µl	10x PCR-Puffer o. MgCl ₂ (Roche, Mannheim, Deutschland)
0,25µl	ROX-Lösung (TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland)
3,5µl	MgCl ₂ (25mM, Roche, Mannheim, Deutschland)
5pmol	Primer1 (Sigma-Genosys, Steinheim, Deutschland)
5pmol	Primer2 (Sigma-Genosys, Steinheim, Deutschland)
5pmol	Sonde (TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland)
10nmol	dNTP-Mix (PqLab, Erlangen, Deutschland)
1,25U	Ampli-Taq-Gold DNA-Polymerase (Roche, Mannheim, Deutschland)
add 25µl ddH ₂ O	

Alle Werte wurden als Triplikate gemessen. Die Messung erfolgte mit dem Mx4000[®] Multiplex Quantitative PCR System (Stratagene, Amsterdam, Niederlande), die Erfassung und Auswertung der Daten mit der dazugehörigen Software (Version 4.20). Mittelwerte und Standardabweichung der Replikate wurden mit dem Microsoft Tabellenkalkulationsprogramm Excel berechnet. Es wurden 45 Zyklen (30s/95°C-ΔTemp.=1,6°C/s-60s/55°C) mit einem initialen Aktivierungsschritt (10min/95°C) durchgeführt.

Um die neutralisierende Wirkung eines Serums bzw. von Antikörpern zu quantifizieren, wurde die Differenz der ct-Werte (Zyklus bei dem das Fluoreszenzsignal einen festgelegten Schwellenwert übersteigt) zwischen Immun- und Präimmunserum bzw. zu infizierten Zellen (ohne Probenzugabe) berechnet.

Aus diesem Wert (ΔCt) wurde wie folgt die Hemmung der Provirusintegration berechnet:

$$\text{Hemmung der Provirusintegration [\%]} = 100 - 100/2^{\Delta Ct \times X}$$

X = Test-abhängiger Korrekturfaktor, der mittels der Verdünnung eines Standard-*Templates* ermittelt wurde. Dieser Faktor hat für die etablierte HIV-spezifische PCR eine Größe von 1,08, für die PERV-spezifische PCR von 1,04.

II.13.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Dideoxymethode nach F. Sanger).

Die Sequenzanalysen erfolgten mit Hilfe des DNA-Sequencer LI-COR-3200 (LI-COR Biotechnology, Lincoln, USA). Zur Erfassung und Auswertung der durch das Lasererfassungssystem detektierten Daten wurde die Software (Data Collection V2.21 DEV7 / Base ImageIR V2.20 Analysis) der Firma LI-COR eingesetzt.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzanalysen wurden markierte ddNTPs im ABI BigDye 3.1-Mastermix verwendet. Pro Reaktionsansatz wurden 100-200fmol (1ng-3µg) der zu sequenzierenden DNA eingesetzt, das Reaktionsvolumen betrug 20µl.

II.14 Biochemische und immunologische Methoden

II.14.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen erfolgte nach der klassischen Bradfordmethode oder durch eine Biuretreaktion (BCA Protein Assay, Pierce, Bonn, Deutschland). Während die Bradfordreaktion auf der Komplexbildung der Proteine mit einem Farbstoff (Coomassie Blue R250, BioRad, München, Deutschland) und der damit verbundenen Verschiebung des Absorptionsspektrums basiert, nutzt der BCA-Assay das Reduktionspotential der Aminosäuren Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan. Durch die Chelatisierung einwertiger Kupferionen mit je 2 Molekülen Bichinoninsäure (BCA) kommt es zu einer Biuretreaktion. Der Komplex hat sein Absorptionsmaximum bei 562nm. Das Ansetzen der Lösungen sowie die Durchführung des Tests erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die Bestimmung der Absorption zur Erstellung einer Eichgeraden sowie des Proteingehaltes einer Probe erfolgte durch dreifache Bestimmungen.

II.14.2 Trennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Trennung von Proteingemischen nach dem Molekulargewicht erfolgte durch SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Laemmli, et al., 1970, Schagger und Jagow, 1988). Die Proben wurden zuvor 1:1 in 2 x Probenauftragspuffer (50mM Tris/12% (v/v), Glycerin/4% (w/v), SDS/5% (v/v), β -Mercaptoethanol/0,01% (w/v) Coomassie Blue G250 (Biorad, Hercules, USA)) aufgenommen, 3min bei 95°C denaturiert und unlösliches Material bei $10^4 \times g$ 5min abzentrifugiert. Es wurden je nach Molekulargewicht des zu trennenden Proteins 10; 12,5 und 16%ige Polyacrylamidtrenngele (88 x 55 x 0,75 mm) mit 4%igen Sammelgelen (10mm) eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei 100-125V (Sammelgel), dann bei 125-175V (Trenngel) in der Gelapparatur Mini Protean II der Firma BioRad.

Die Zusammensetzung der Gele und verwendeten Puffer ist im Folgenden dargestellt:

Acryamid (%)	4%	10%	12%	14%	16%
Gelpuffer	1ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml
Acyl/Bisacryamid-Lsg.	0,4ml	2,5ml	3ml	3,5ml	4ml
ddH ₂ O	1,6ml	2,5ml	2ml	1,5ml	1ml
APS (10%)	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l

Gelpuffer: 0,1M Tris/0,3% (w/v) SDS /pH 8,4

TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, USB, Cleveland, USA

Acyl/Bisacryamid: 37,5:1 (30%), Rotiphorese Gel30, Roth Karlsruhe, Deutschland

Kathodenpuffer: 0,1M Tris/ 0,1M Tricin/ 0,1% (w/v) SDS/pH 8,25

Anodenpuffer : 0,2M Tris/ pH 8,9

Entfärbe-Lösung: 10%(v/v) Essigsäure/25%(v/v) Methanol in ddH₂O

Färbelösung: 0,1 % (w/v Coomassie R250/10 % (v/v) Trichloressigsäure/
50 % (v/v) Methanol

II.14.3 Isolierung PERV-p15E-spezifischer Antikörper durch Affinitätschromatographie

Zur immunologischen Analyse (Western Blot/ ELISA/ FACS/ Immunfluoreszenz/ Epitopkartierung) p15E-spezifischer Antikörper wurden neben dem entsprechenden Immunserum auch aus dem Serum isolierte spezifische Antikörper eingesetzt. Bei besonders sensitiven Analyseverfahren, wie FACS, Epitopkartierung und Immunfluoreszenz können so störende Kreuzreaktionen vermieden und besser interpretierbare Ergebnisse erzielt werden. Durch den Einsatz isolierter Antikörper im Neutralisationsassay wurde der Beweis der antikörperabhängigen Neutralisation erbracht und antivirale Wirkung der Seren durch Cytokine oder Chemokine ausgeschlossen. Die p15E-spezifischen Antikörper wurden durch Isolierung aus Ziegenserum (Ziege20) mittels Affinitätschromatographie gewonnen.

Das Serum (ca. 15ml) wurde mit einem Glasstab homogenisiert und unter Eiskühlung tropfenweise mit 4M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (pH 8,0) im Verhältnis 1:1 versetzt und eine Stunde bei 4°C gerührt. Die so ausgefällten Proteine wurden bei 4°C/3000xg 10min pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 0,9%iger NaCl (w/v) Lösung (2/3 des Ausgangsvolumen) gelöst. Nach erneuter Fällung wurde das Pellet in 1/3 des Ausgangsvolumens aufgenommen und gegen Chromatographiepuffer (20mM Na_2HPO_4 , 500mM NaCl, pH 7,0) dialysiert bis die Proteinlösung klar war.

Zur Herstellung der Affinitätssäule wurde CH-Sepharose 4B der Firma Pharmacia verwandt. Die Aktivierung der Sepharose, die Kopplung mit gereinigten p15E sowie das Blockieren, Waschen und die Lagerung der Säule erfolgte nach Herstellerangaben. Das Säulenvolumen betrug 6ml.

Die Säule wurde gegen Chromatographiepuffer äquilibriert und dann wurde die Proteinlösung (ca. 10ml) mit einer Fließgeschwindigkeit von 5ml/h aufgetragen. Nach Auftrag des Serums wurde die Säule mit Chromatographiepuffer solange gewaschen bis die Proteinkonzentration im Durchfluss unter 5µg/ml lag. Danach erfolgte die Elution mit 15ml 0,1M Glycin/HCl (pH 2,7) bei einer Fließgeschwindigkeit von 10ml/h. Das Eluat wurde in 10 Fraktionen á 2ml gesammelt, wobei in die Reagenzgläser je 200µl einer 300mM Tris (pH 9,0)-Lösung vorgelegt wurde, um das Eluat sofort zu neutralisieren.

Nach der Elution wurde die Säule sofort mit zweimal 1ml 300mM Tris-Lösung neutralisiert (20ml/h) und mit 0,02 % Natriumazid (w/v) in Chromatographiepuffer äquilibriert.

Die einzelnen Fraktionen wurden im Bradford-Proteinbestimmungsassay und im ELISA getestet.

II.14.4 IgG-Isolierung durch ProteinG-Chromatographie

Gegen das Transmembranprotein von HIV-1 (gp41) gerichtete Antikörper konnten nicht über eine spezifische Antigen-Affinitätschromatographie aus Seren isoliert werden, da das gp41 in wässrigen Lösungen präzipitierte, was eine Kopplung an Sepharose unmöglich macht. Um IgG's von restlichen Serumsbestandteilen abzutrennen wurde ein Montage[®] Antibody Purification Kit (Millipore, Billerica, USA) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Diese Methode erlaubt eine schnelle und einfache Isolation von Immunglobulinen der Klasse G, wobei allerdings speziesabhängig nicht alle Subklassen isoliert werden können. Bei Anwendung dieser Methode muss damit gerechnet werden, dass neben anderen Immunglobulinen (wie z.B. IgM oder IgA) auch antigenspezifische IgG verloren gehen.

II.14.5 Epitopkartierung

Zur Identifizierung der Antikörperbindungsstellen (Epitopkartierung) innerhalb eines bekannten Antigens wurden Pepspot-Membranen (Jerini, Berlin, Deutschland), die aus jeweils um 13 Aminosäuren überlappenden 15meren Peptiden bestand, verwendet. Diese Peptide wurden in Form von „PepSpots“ auf einer Zellulosemembran immobilisiert. Die verwendeten Peptide wurden kovalent über den C-Terminus an die Membran gekoppelt und sind N-terminal mit einem Acetylrest als Schutzgruppe versehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Membranen verwendet, die die Aminosäuresequenz der Transmembranproteine des HIV-1 IIIB (gp41) und PERV A (p15E) repräsentieren. Die Inkubation der zu untersuchenden Seren bzw. Antikörper erfolgte nach Herstellerangaben. Die Seren wurden 1:500 in Blockierungspuffer verdünnt, als Kontrolle wurde das jeweilige Präimmunserum verwendet.

II.14.6 Western Blot Analyse

Die immunologische Analyse der durch SDS-PAA-Gelelektrophorese massenabhängig aufgetrennten Proteine erfolgte mittels Western Blot (Towbin et al., 1989). Durch diese Technik können sehr spezifisch geringe Mengen (< 2 ng) eines bestimmten Proteins nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde das *Semidry-Blotting*-Verfahren (Biorad Trans-Blot SD[®], Semi-Dry Transfer Cell, Biorad, Hercules, USA) eingesetzt. Die Proteine wurden bei 12V/45min auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid, 0,2µm, Millipore, Billerica, USA) geblottet. Um unspezifische Bindungen zu minimieren wurde die geblottete Membran 2h bei RT geblockt

(10% FKS in PBS). Die Inkubation mit dem primären Antikörper (primäres Antiserum bzw. Präimmunserum in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:1000, monoklonale Antikörper 0,3µg/ml) erfolgte über Nacht bei 4°C in Blockierungspuffer. Nach dreimaligen Waschen (je 10min in 50ml PBS/0,05% Tween20/pH 7,4) wurde die Membran für 2h/RT mit einem Primärantikörper-spezifischen, POD-konjugierten Detektionsantikörper (siehe 2.3.) inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen (w.o.) entfernt und die Membran für 10min in 50ml einer 25mM Tris-Lösung (pH 8,0) geschwenkt. Anschließend erfolgte die Detektion der gebundenen POD-Konjugate durch eine DAB-Substratlösung (25mM Tris/ 0,5mg/ml Diaminobenzidin (DAB/0,05% H₂O₂)). Die Entwicklung wurde solange fortgeführt, bis braune Banden zu erkennen waren und dann durch Spülen mit Wasser (bidest.) abgebrochen. Um ein späteres Nachdunkeln des Blots zu verhindern, wurde die Membran dreimal 10min in Wasser (bidest.) gespült. Zur Lagerung wurde die Membran zwischen Filterpapieren getrocknet, in Folie eingeschweißt und lichtgeschützt aufbewahrt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden unter leichtem Schütteln auf einem Inkubationsschüttler durchgeführt.

II.14.7 ELISA

Der *enzyme linked immuno sorbet assays* (ELISA) wurde neben der Western Blot Analyse zur spezifischen Detektion von Antikörpern genutzt. Der Nachweis beruht, wie der Western Blot, auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die durch ein Primärantikörper-spezifisches Antikörper-Enzym-Konjugat quantifiziert werden kann.

Im Vergleich zur Western Blot Analyse ermöglicht der ELISA die Titerbestimmung der im Serum enthaltenen bindenden Antikörper sowie die Bestimmung der Avidität (Bindungsenergie eines Antikörpers/Antiserum zu seinem Antigen) monoklonaler Antikörper oder Antiseren zu ihrem Antigen.

Um die Avidität von Seren und Antikörpern zu Peptiden und rekombinanten Proteinen zu vergleichen, wurden zunächst diese Antigene in einem geeigneten Lösungsmittel (10%DMSO in ddH₂O oder ddH₂O) auf eine Nunc Probind™-96-Well-Platte aufgebracht und ü.N. bei 37°C eingedampft. Ungesättigte Bindungsstellen auf der Plattenoberfläche wurden durch einstündige Inkubation mit 200µl Blockierungspuffer/Well (10% FKS in PBS) blockiert. Die Platte wurde in einem Tecan ELISA-Washer mit 300µl Waschpuffer/Well (PBS/0,05% Tween20) dreimal gewaschen. Die Primärseren/-antikörper wurden in geeigneter Konzentration in PBS/0,05% Tween20 (100µl Volumen) mit unterschiedlichen Konzentrationen Harnstoff (0-8M) für 2h bei 37°C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch drei Waschzyklen entfernt. Das Sekundärantikörper-POD-Konjugat (100µl

Volumen) wurde in geeigneter Konzentration (0,2-1µg/ml) in Blockierungspuffer für 2h bei 37°C auf der Platte inkubiert. Ungebundene Sekundärantikörperkonjugate wurden durch fünf Waschzyklen entfernt. Die Platte wurde durch Ausschlagen von allen Flüssigkeitsresten befreit und mit 50µl/well Substratlösung (PBS pH 6,0/ 1mg/ml o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid) inkubiert bis eine deutliche Farbreaktion festzustellen war (1-15min). Durch Zugabe von 25µl Tritisol™ (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde die enzymatische Substratumsetzung gestoppt. Die Farbreaktion wurde mit einem Tecan ELISA-Reader Classic (TECAN, Grodig, Österreich) bei 492/620nm quantifiziert. Alle Ansätze wurden in drei oder vier Replikaten gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate wurden mit dem Tabellenkalkulations-Programm Microsoft-Excel berechnet.

Zur Bestimmung der Titer spezifischer Antikörper in Seren nach einer Immunisierung wurden die Seren gegen die entsprechenden Präimmunseren ausverdünnt. Der Titer eines Serums entspricht der letzten Verdünnungsstufe, bei der die Absorption signifikant über dem Hintergrund durch das Präimmunserum liegt.

II.14.8 Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur spezifischen Detektion viraler Proteine auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren wurde die Immunfluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Dazu wurden Zielprotein-spezifische Antikörper mit infizierten und uninfizierten Zellen inkubiert. Um intrazellulär vorliegende Proteine zu detektieren, wurde die Membran mittels Detergenz (Inkubation mit 0,5% Triton in PBS für 15min bei RT) permeabilisiert. Die spezifische Bindung dieser Antikörper wurde mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (0,5µg/ml FITC-Konjugat, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) detektiert. Wird der Fluoreszenzfarbstoff über eine UV-Lichtquelle angeregt, wird Licht einer farbstoffspezifischen Wellenlänge vom Fluorophor-Antikörperkonjugat emittiert, das durch den Einsatz abgestimmter Filter, die die interferierende Wellenlängen ausblenden, sichtbar wird.

PERV-infizierte und naive 293-Zellen wurden auf Objektträgern ausgesät und kultiviert. Die adhärente Kultur wurde nach zwei Tagen mit PBS gespült und in 2%-Formaldehydlösung in PBS für 1h fixiert. Anschließend wurde dreimal je 10min mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren, wurde der Objektträger 1h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer inkubiert, bevor das Primärserum (1:1000) bzw. Primärantikörper (1µg/ml, 2h/RT/in Blockierungspuffer) zugegeben wurde. Die Zellen wurden erneut dreimal für je 10min mit PBS gewaschen und anschließend 1h mit FITC-konjugierten Sekundärantikörper in Blockierungspuffer in Dunkelheit inkubiert.

Um den Fluoreszenzfarbstoff zu stabilisieren, wurden die Zellen mit einem Eindeckmittel (Pro Long, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) behandelt. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Nikon Eclipse 300 Fluoreszenzmikroskop (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) gemacht.

II.14.9 Durchfluss-Zytometrie

Zur immunologischen Analyse von Zellen wurde die Durchflusszytometrie (Flow Cytometrie/FACS, *fluorescence activated cell sorting*) eingesetzt. Die Zellen wurden zuvor mit Fluoreszenz-Farbstoffen spezifisch, über Antikörper-Konjugate markiert, die nach Anregung Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Für die in dieser Arbeit durchgeführten FACS-Analysen wurde das FACSCalibur (BD Biosciences, USA) eingesetzt, die Auswertung der Fluoreszenzmessung erfolgte über die mitgelieferte Software.

In den Untersuchungen wurden nicht permeabilisierte Zellen eingesetzt, da die Bindung spezifischer Seren (Ziege 16/20 und gereinigte Antikörper) an das native Transmembranprotein PERV-p15E auf der Zelloberfläche analysiert werden sollte. Dazu wurden 2×10^6 adhärenente Zellen einer PERV-infizierten Kultur mechanisch vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Resuspendieren vereinzelt und dreimal mit je 30ml PBS gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde die Zellsuspension bei 500xg 10min pelletiert und der Überstand verworfen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu unterbinden, wurden die Zellen in 30ml Blockierungspuffer (PBS mit 10% FKS) inkubiert. Die blockierten Zellen wurden pelletiert (w.o.) und das Pellet in 30ml der Primärantikörperlösung (Seren 1:2000/gereinigte Antikörper 100µg/ml in Blockierungspuffer verdünnt) aufgenommen und 60min leicht schüttelnd auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde pelletiert und fünfmal mit eiskaltem PBS gewaschen (w.o.). Die Inkubation der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Ziege-IgG-Fc-FITC-Konjugat, 0,5µg/ml in Blockierungspuffer, siehe 2.3.) erfolgte in Dunkelheit (w.o.). Nach weiteren fünf Waschschritten wurde das Pellet in einer 2%igen Formaldehydlösung (v/v) aufgenommen und fein resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde direkt im Zytometer analysiert.

II.14.10 Kopplung von synthetischen Peptiden an Trägermoleküle

Um eine gesteigerte Immunogenität durch Multimerisierung von synthetischen Peptiden zu erreichen, wurden verschiedene Kopplungsmethoden eingesetzt:

- Kopplung an KLH und BSA

Die Kopplung von Peptiden an Trägerproteine wie BSA oder KLH erfolgte unter Verwendung eines reaktiven Carbodiimid-Linkers (EDC, 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid, Pierce, Bonn, Deutschland). Durch die Reaktion mit den Carboxylgruppen der Peptide bildet EDC ein reaktives Zwischenprodukt, das mit den primären Aminen eine kovalente Amidbindung eingehen kann. Die Kopplung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Es wurden 2mg der synthetischen Peptide (4mg/ml) mit 1mg des Trägerproteins (5mg/ml) gekoppelt, was etwa einem 30fachen molaren Überschuss an synthetischen Peptiden darstellt.

- Kopplung an Dextran

Neben BSA oder KLH wurde als Trägermolekül ein Polysaccharid (Dextran6, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 6kDa verwendet. Vorteil von Polysacchariden als Trägermolekülen, ist dass diese alleine nicht immunogen sind und sich dadurch die Immunantwort hauptsächlich gegen das gekoppelte Peptid richtet. Die Konjugation erfolgte über die α - oder ϵ -Aminogruppen der Peptide an durch NaIO_4 -Behandlung aktiviertes Dextran6. Die Kopplung von 4mg Dextran mit 8mg Peptid erfolgte nach Böcher et al. (1992).

Die Kopplung von Peptiden über primäre Aminogruppen ist zwar eine relativ einfache und effektive Methode zur Herstellung von Peptid-Dextran-Konjugaten, jedoch kann so nur ein heterogenes Kopplungsprodukt erhalten werden. Je nach Anzahl der im Peptid enthaltenen primären Aminogruppen vergrößert sich die Anzahl der möglichen Produkte und die Wahrscheinlichkeit von Quervernetzungen zwischen den Molekülen. Eine zielgerichtete und definierte Bindung des Peptids an das Trägermolekül ermöglicht der Einsatz von bifunktionalen Linkern, wie 3-(2-Pyridyldithio)propionylhydrazid (PDPH). Dieser verbindet eine Sulfhydrylgruppen (die z.B. durch Cystein in das Peptid eingefügt wurde) des Peptids mit einer Carbonylgruppe des Dextrans (Hermanson et al., 1996). Vorausgesetzt, es ist nur eine schwefelhaltige Aminosäure vorhanden, kann so nur ein einziges Produkt entstehen. Die Vernetzung von Dextranmolekülen ist nicht möglich. Die Kopplung von 4mg Dextran mit 8mg Peptid erfolgte nach Zara et al. (1991).

- Vernetzung von Cystein-flankierten Peptiden zu Di- und Trimeren

Die Peptide sollten über die endständigen Cysteine unter Ausbildung einer Disulfidbrücke

oxidiert werden und damit Di- bzw. Trimere ausbilden. Die Ausbildung von Trimeren sollte durch das Einfügen eines zweiten endständigen Cysteins in eines der beiden zu koppelnden Peptide ermöglicht werden. Die Peptide wurden in bidestillierten Wasser in einem Glasgefäß gelöst und durch Zugabe von reinem Ammoniak auf einen pH 8.5 eingestellt. Im basischen Milieu dissoziieren Protonen von den Sulhydrylgruppen, dadurch wird der Schwefel reaktiv. Mit Hilfe einer Pipette wurde Luft (gasförmiger Sauerstoff) in die Lösung eingeblasen. Die Oxidation wurde über SDS-PAGE und Western Blot Analyse kontrolliert.

Die Kopplungsprodukte wurden ü.N. gegen PBS dialysiert, um ungekoppelte Peptide, Trägermoleküle und Kopplungschemikalien zu entfernen. Die Konjugate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse charakterisiert. Die Ausbeuten an gekoppelten Peptiden wurden durch BCA-Proteinkonzentrationsbestimmungssassays bestimmt (siehe 2.14.1).

II.14.11 Herstellung von Acetonpuder aus Bakterienlysat

Die für immunchemische Analysen verwendeten Seren enthalten neben spezifischen Antikörpern auch Immunglobuline, die eine Affinität zu verschiedenen *E. coli*-Proteinen besitzen. Um dadurch bedingte unspezifische Signale zu unterbinden, wurden diese Immunglobuline vor der Primärantikörperinkubation durch Bindung und Ausfällung an *E. coli*-Proteine in Form von Acetonpuder entfernt.

Zur Herstellung des Acetonpuders wurden 200ml einer induzierten und mit dem Leervector transformierten BL 21 *E. coli*-Kultur mit 3000xg abzentrifugiert und das Zellsediment in 3ml PBS resuspendiert. Danach wurden die Bakterien durch 5 Ultraschallimpulse (à 15s) auf Eis lysiert und die Proteine durch Zugabe von 12ml Aceton (-20°C) für 30 min präzipitiert. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (10min/3000 x g) und in 3ml frischem Aceton resuspendiert. Es wurde erneut zentrifugiert (w.o.) und der Überstand dekantiert. Das Proteinpellet wurde getrocknet und fein zermahlen.

Zur Adsorption wurde die Primärantikörperlösung mit 6mg/ml Acetonpuder versetzt und 60min bei 4°C leicht schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Lösung zentrifugiert (w.o.) und der Überstand als Primärantikörperlösung im Western Blot bzw. im ELISA verwendet.

II.14.12 Dichtegradientenzentrifugation

Um Viren aus Zellkulturüberständen zu konzentrieren und von Zell- und Mediumbestandteilen zu separieren, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt.

Zur Vorreinigung und Konzentration wurden die Zellkulturüberstände 3h bei $10^6 \times g$ durch ein 22%iges Saccharosekissen zentrifugiert (Rotor SW28, Beckman-Coulter CU-L8-70 Ultrazentrifuge). Dazu wurde 4ml einer 22%igen Saccharoselösung in ein Zentrifugenröhrchen (Beckman Ultra-Clear 25x89mm) vorgelegt und vorsichtig mit 28ml Virusüberstand überschichtet. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Viruspellet ü.N. in 0,5ml TSE bei 4°C gelöst. Die gelösten Pellets von 6 Röhrchen wurden vereinigt und auf einen vorbereiteten Saccharosegradienten (15-65% in einem Beckman Ultra-Clear 10x89mm-Zentrifugenröhrchen) geschichtet. Der Gradient wurde aus einer 15%igen und einer 65%igen Saccharoselösung mit Hilfe eines Gradientenmischers (Biorad, Hercules, USA) hergestellt. Retroviren banden bei einer Dichte von $1,1663 \text{ g/cm}^3$ (38% Sucrose). Nach 4stündiger Zentrifugation bei $10^6 \times g$ (Rotor SW41, Beckman-Coulter) bildet sich bei dieser Dichte ein weißer Ring, der vorsichtig mit einer Kanüle durch seitliches Einstechen abgenommen wurde. Die Dichte der entnommenen Fraktionen wurde in einem Refraktometer bestimmt. Der Virusgehalt wurde durch Bestimmung der Aktivität der reversen Transkriptase und durch Western Blot Analyse bestimmt.

II.14.13 Quantifizierung der reversen Transkriptase

Durch Bestimmung der RT-Aktivität (reverse Transkriptase) einer Probe kann die produktive Infektion einer Zellkultur oder eines Organismus durch Retroviren nachgewiesen und quantifiziert werden. Die RT ist ein nur in Retroviren vorkommendes Enzym, das die Synthese der proviralen DNA katalysiert

Die Quantifizierung der RT-Aktivität erfolgte mit Hilfe des kommerziellen HS-Kit Mg^{2+} (Cavidi Tech AB, Upsala, Schweden), die Proben wurden als Triplikate bestimmt, die Messung der Farbreaktion erfolgte im Tecan ELISA-Reader Classic (TECAN, Grodig, Österreich), die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel (Microsoft). Es wurde nach dem „über Nacht-Protokoll“ des Herstellers verfahren.

Die RT-Aktivität von Überständen infizierter Zelllinien wurde immer mit der von Überständen der naiven Zellen verglichen, da diese oft mit Segmenten eines retroviralen Genoms transformiert sind (z.B. C8166 mit einem defektem HTLV-II-Genom), was zu einem falschpositiven Ergebnis führen kann.

II.15 Durchführung der Tierversuche

II.15.1 Versuchstiere

Zur Immunisierung wurden 8-12 Wochen alte, weibliche Wistar-Ratten vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR, Berlin, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden in der Tierversuchsabteilung des Robert Koch Instituts gehalten. Die Ziegen wurden in der Tierversuchsanstalt des BfR, Berlin-Marienfelde gehalten.

II.15.2 Applikation des Antigens

Das Antigen wurde in PBS aufgenommen und 1:1 mit Freund's Adjuvant (Pierce, Bonn, Deutschland) vermischt und durch mehrmaliges Resuspendieren durch eine 0,6mm Kanüle (BD, Heidelberg, Deutschland) emulgiert.

Die Immunisierung der Ratten erfolgte intramuskulär (je 250µl in die Muskulatur der Hinterläufe) und subcutan (500µl unter das Nackenfell), die Immunisierung der Ziegen intramuskulär (je 500µl in die Muskulatur der Hinterläufe) mit 0,5mg Antigen in 1ml Emulsion. Der Boost erfolgte nach 21 Tagen nach gleichem Applikationsschema.

II.15.3 Blutabnahme und Serumgewinnung

Die Blutentnahme bei Ratten (ca. 1,5ml) erfolgte durch retrobulbäre Punktion unter Inhalationsnarkose durch Isofluran (Cuarmed, Karlsruhe, Deutschland), bei Ziegen (ca. 50ml) aus der Halsvene. Nach einwöchiger Akklimatisierungsphase wurde Präimmunblut, 21 Tage nach der Boostimmunisierung Immunblut entnommen. Weitere Blutungen erfolgten je nach Bedarf, aber maximal im 14-tägigen Abstand.

Das Blut wurde 30min bei 20°C und danach 15h bei 4°C gelagert. Nach dieser Zeit wurde das entstandene Koagulat 15min bei 40000xg pelletiert, der Serumsüberstand abgenommen, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

II.16 Virologische und zellbiologische Methoden

II.16.1 Verwendete Zellen, Medien und Viren

Zellen:

- C8166: Humane T-Zelllinie mit defektem HTLV-II-Genom (AIDS Research and Reference Program, Division of AIDS, NIAID, NIH; R. Gallo (Salahuddin et al., 1983))
- 293: Humane embryonale Nierenzelllinie (ATCC, Manassas, VA, USA)

Medien und Zusätze:

RPMI (für C8166)	(Invitrogen, Leek, Niederlande)
10%(v/v) FKS	(Biochrom, Berlin, Deutschland)
2% (v/v) L-Glutamin-Lösung (200mM)	(Biochrom, Berlin, Deutschland)
1,5% (v/v) HEPES (1M)	(Biochrom, Berlin, Deutschland)
10 ⁴ U/ml Penicillin	(Biochrom, Berlin, Deutschland)
10 mg/ml Streptomycin	(Biochrom, Berlin, Deutschland)

RPMI (für 293)	(Invitrogen, Leek, Niederlande)
10%(v/v) FKS	(Biochrom, Berlin, Deutschland)
2% (v/v) L-Glutamin-Lösung (200mM)	(Biochrom, Berlin, Deutschland)
1% (v/v) HEPES (1M)	(Biochrom, Berlin, Deutschland)
10 ⁴ U/ml Penicillin	(Biochrom, Berlin, Deutschland)
10 mg/ml Streptomycin	(Biochrom, Berlin, Deutschland)

Viren

HIV-1 IIIB	(zur Verfügung gestellt von Dr. C. Kücherer, Robert Koch-Institut)
PERV/5°	(Specke et al., 2001)

II.16.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die langfristige Lagerung von Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Um die Zerstörung der Zellen durch Bildung von Eiskristallen zu minimieren, wurden diese in speziellen Einfriermedium (90% FKS, 10% DMSO) inkubiert.

Die Zellen wurden resuspendiert und 10min bei $10^3 \times g$ pelletiert. Das Zellpellet wurde in sterilem Einfriermedium aufgenommen, resuspendiert und je 1ml der Suspension in sterile Kryoröhrchen überführt. Um einen schonenden Einfrierprozess zu gewährleisten, wurden die Röhrchen in Zellstoff gewickelt und in einer verschlossenen Styroporbox 16h bei -80°C gelagert. Im Anschluss wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

II.16.3 Anlegen von Virusstocks

Um eine gute Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der verschiedenen Versuche gewährleisten zu können, wurden in allen Infektionsversuchen einheitliche Virusstocks eingesetzt. Titrierte Virusüberstände wurden in Kryoröhrchen in 1ml Aliquots in flüssigem Stickstoff bis zu ihrer Verwendung gelagert.

Die Berechnung der $TCID_{50}/ml$ wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$\left[\left(D_s^{((x/Reps)+0,5)} / ((1/D_0) * D_s * (Vol / 10^3)) \right) \right]$$

D_s = Verdünnungsstufen

x = Anzahl der infizierten Wells

$Reps$ = Anzahl der Replikate

D_0 = erste Verdünnungsstufe

V = Volumen des Virusstocks im Well

HIV-1 IIIB Stocks:

Zum Anlegen von HIV-Überständen wurde eine frisch passagierte C8166-Kultur (1:5 aus einer dicht gewachsenen Kultur) in einer T175-Zellkulturflasche (TPP, Midwest Scientific St. Louis, MO, USA) mit 1×10^4 $TCID_{50}$ HIV-IIIB infiziert und bei 37°C, 95% Luftfeuchte und 5%CO₂ inkubiert. Nach 72h wurde die Kultur in 50ml Röhrchen überführt und bei $750 \times g$ pelletiert. Der Überstand wurde filtriert (0,45µm) und in 1ml Portionen bei -196°C bis zur Verwendung gelagert. Zur Bestimmung der im Überstand enthaltenen infektiösen Partikel ($TCID_{50}$) wurde ein Aliquot aufgetaut und auf C8166 titriert. Nach 72h Inkubation wurde die HIV-Provirusintegration über eine *Pol*-spezifische PCR nachgewiesen (siehe 2.13.7.).

PERV-5° Stocks:

PERV-5°-Überstände wurden von einer konvluenten gewachsenen, infizierten 293-Kultur entnommen. Aufbereitung und Lagerung erfolgte analog zur Behandlung der HIV-Überstände (siehe oben). Die Titration der Überstände zur Bestimmung der TCID₅₀ erfolgte auf uninfizierten 293-Zellen. Der Nachweis der Provirusintegration erfolgte wie unter 2.13.7. beschrieben.

II.16.4 Neutralisationsassay PERV

Zum Nachweis der PERV-neutralisierenden Aktivität induzierter Seren wurde ein *in-vitro*-Neutralisationstest etabliert. Dieser Test basiert auf dem Nachweis der PERV-Provirusintegration nach 9-tägiger Inkubation uninfizierter 293-Zellen mit PERV-Überständen in Anwesenheit von Medium, Präimmunserum und Immunsrum, durch PCR mit PERV-*Pol*-spezifischen Primern (PK1/6, siehe 2.5.).

Dazu wurden pro Well 3×10^3 uninfizierte 293-Zellen in 100µl Medium in einer sterilen 96-Well-Flachbodenplatte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät. Nach 24stündiger Inkubation im Zellkulturbrutschrank wurde das Medium abgenommen, dabei wurde darauf geachtet, dass die adhärennten 293-Zellen nicht durch Kratzen auf dem Boden oder zu starken Sog abgelöst wurden. In einer zweiten Platte wurden vorher 100µl PERV-5°-Virusstock in einer 1:2 Verdünnung ausverdünnt und mit 100µl vorverdünnten Serum (1:10 bzw. 1:20 Verdünnung im Well) gemischt und bei 37° für 45min im Brutschrank inkubiert. Die verwendeten Seren wurden zuvor durch 30min Inkubation bei 56°C dekomplementiert. Die mit den Seren vorinkubierten Überstände wurden dann auf die Zellen pipettiert. Am Tag drei und sechs wurden die Überstände abgenommen, mit 200µl PBS "ohne" gespült, mit 50µl einer 0,25%igen Trypsinlösung von der Platte gelöst und durch mehrmaliges Resuspendieren in 150µl frischem Medium vereinzelt. 100µl der Zellsuspension wurden verworfen und zu den verbleibenden Zellen 150µl frisches Medium gegeben. Am Tag neun nach der Infektion wurden die Überstände abgenommen und die Zellen lysiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch dreimaliges Einfrieren (-80°C) und Auftauen (56°C). Durch die anschließende dreistündige Inkubation mit 100µl einer Proteinase K-Lösung (Invitrogen, Leek, Niederlande) bei 56°C wurden DNA-assoziierte Proteine enzymatisch abverdaut. Die anschließende Inaktivierung der Proteinase K erfolgte bei 95°C für 30min. Das Zelllysate wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert oder direkt als *Template* für die Provirusnachweis-PCR eingesetzt.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde zum Nachweis der Provirusintegration ein *Realtime* Assay etabliert. Spätere Messungen zur Quantifizierung der Provirusintegration erfolgten mit Hilfe dieses Assays. Die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben. Durch die hohe Sensitivität und dem Wegfall einer Endpunktbestimmung bei diesem Assay konnte jedoch das Splitten der Zellen und das Ausverdünnen des Virusstocks wegfallen. Die Zellen wurden mit einer TCID₅₀ von $1 \times 10^{2,43}$ /ml inkubiert, die Lyse erfolgte nach 72h. Alle Proben wurden als Triplikate gemessen

II.16.5 Neutralisationsassay HIV

Der Nachweis HIV-neutralisierender Aktivität induzierter Seren erfolgte im Wesentlichen analog zum PERV-Neutralisationsassay (2.16.4.). Seren und monoklonale Antikörper wurden mit einer TCID₅₀ von 1×10^3 vorinkubiert (w.o.) und dann 72h mit 5×10^4 C8166 Zellen (Gesamtvolumen 200µl/well) inkubiert. Die Quantifizierung der Provirusintegration erfolgte durch Realtime PCR.

III Ergebnisse

III.1 Induktion PERV-neutralisierender Antikörper

Ziel der Arbeiten war die Induktion neutralisierender Antikörper gegen transmembrane Hüllproteine von Retroviren sowie die Aufklärung des Wirkmechanismus solcher Antikörper. In der vorliegenden Arbeit wurde dabei der Schwerpunkt auf das humane Lentivirus HIV und auf das porzine endogene Gammaretrovirus (PERV) gelegt. Durch die Aufklärung des Bindungs- und Neutralisationsmechanismus PERV-neutralisierender sowie des monoklonalen, HIV-neutralisierenden Antikörpers 2F5, sollten wichtige Hinweise zur Konstruktion von Antigenen erlangt und umgesetzt werden, die zur Induktion von neutralisierenden Antikörpern geeignet sind.

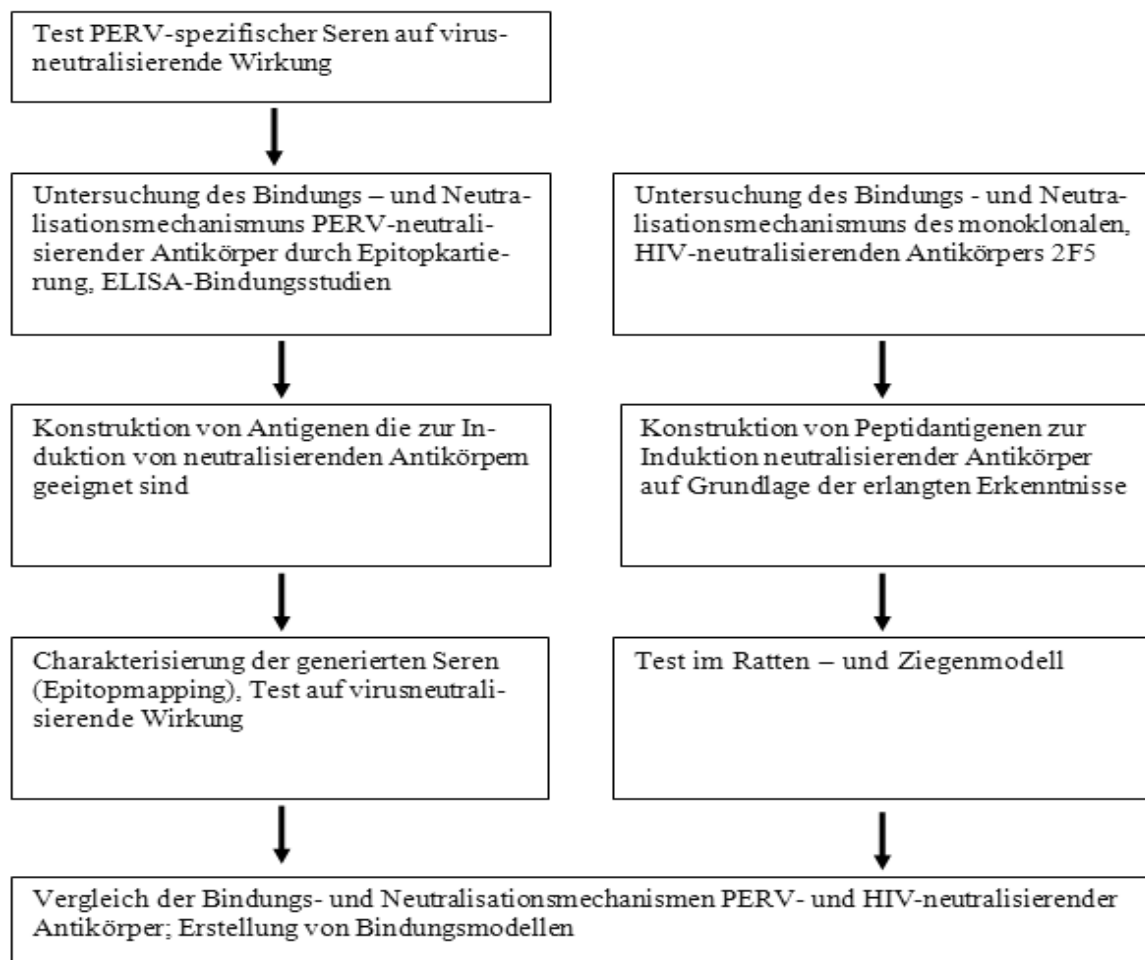


Abb. III.1: Versuchsstrategie zur Induktion neutralisierender Antikörper gegen das porzine endogene Retrovirus (PERV) und das humane Immundefizienzvirus (HIV-1).

Die Aufklärung des Bindungs- und Neutralisationsmechanismus PERV- bzw. HIV-neutralisierender Antikörper soll Basis für die Entwicklung effektiver Antigene sein, die sich zur Induktion einer schützenden Immunantwort eignen.

III.1.1 Generierung und Charakterisierung von Ziegenserum gegen rekombinantes p15E

Zur Immunisierung von zwei Ziegen (Ziege 16 und 20) wurde die Ektodomäne des transmembranen Hüllproteins p15E rekombinant generiert. Dazu wurde aus PK15-Zellen, einer porzinen Nierenzelllinie, die kodierende Sequenz amplifiziert, in einen Expressionsvektor kloniert und als CBP-Fusionsprotein exprimiert. Durch Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem klonierten Konstrukt um die Sequenz des Hüllproteins von PERV-A handelt. Die Sequenz des rekombinanten p15E ist 100% homolog zu dem in späteren Neutralisationstest eingesetzten PERV-5°-Klon.

Die Aufreinigung des rekombinanten Proteins erfolgte affinitätschromatographisch über das als Fusionsprotein angefügte Calmodulinbindeprotein (CBP). Calmodulin ist ein in allen eukaryontischen Zellen anzutreffendes Protein. Seine Aminosäuresequenz, und die seines natürlichen Liganden, CBP, ist in den unterschiedlichsten Spezies sehr hoch konserviert. Humanes CBP ist zu 100% mit dem der Ratten und Ziegen identisch. Eine Induktion von CBP-bindenden Antikörpern war damit durch die natürliche Toleranz gegen körpereigene Proteine nicht zu erwarten und wurde auch nicht beobachtet.

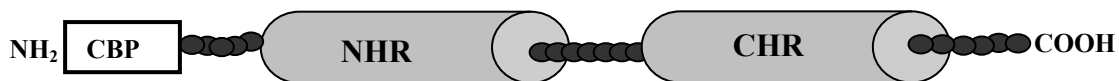


Abb. III.2: Schematische Darstellung des zur Immunisierung eingesetzten rekombinanten rp15E.

Das Molekül ist im linearisierten Zustand dargestellt. Die N-terminale (NHR) und die C-terminale (CHR)-Helixregion sind grau hervorgehoben. Am N-Terminus wurde ein Fusionsprotein angefügt (CBP). Das N-terminale Fusionspeptid sowie der C-terminal gelegene Transmembrandurchgang und zytoplasmatische Teil wurden deletiert.

Western Blot Analyse und ELISA

Durch Western Blot Analyse und ELISA konnte gezeigt werden, dass in beiden Tieren p15E-spezifische Antikörper induziert werden konnten. In den immunochemischen Analysen wird sowohl das virale, wie auch das rekombinant generierte p15E detektiert (Abb. III.3 A). Die Deletion des Fusionspeptids, des Transmembrandurchgangs sowie des zytoplasmatischen Teils beeinflusst also nicht die Bindung der induzierten Antikörper an das virale p15E in der Western Blot Analyse.

Im ELISA wurden in beiden Seren hohe Titer an p15E-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Eine spezifische Bindung war für beide Immunseren bis zu einer Verdünnung von 1×10^6 detektierbar (Abb. III.3 B). Damit eigneten sich die induzierten Seren sowie das rekombinante p15E auch sehr gut als Kontrollseren bzw. Antigen für die Entwicklung immunologischer Nachweissysteme, analog zu den derzeit in der klinischen Praxis verbreiteten HIV-Testsystemen.

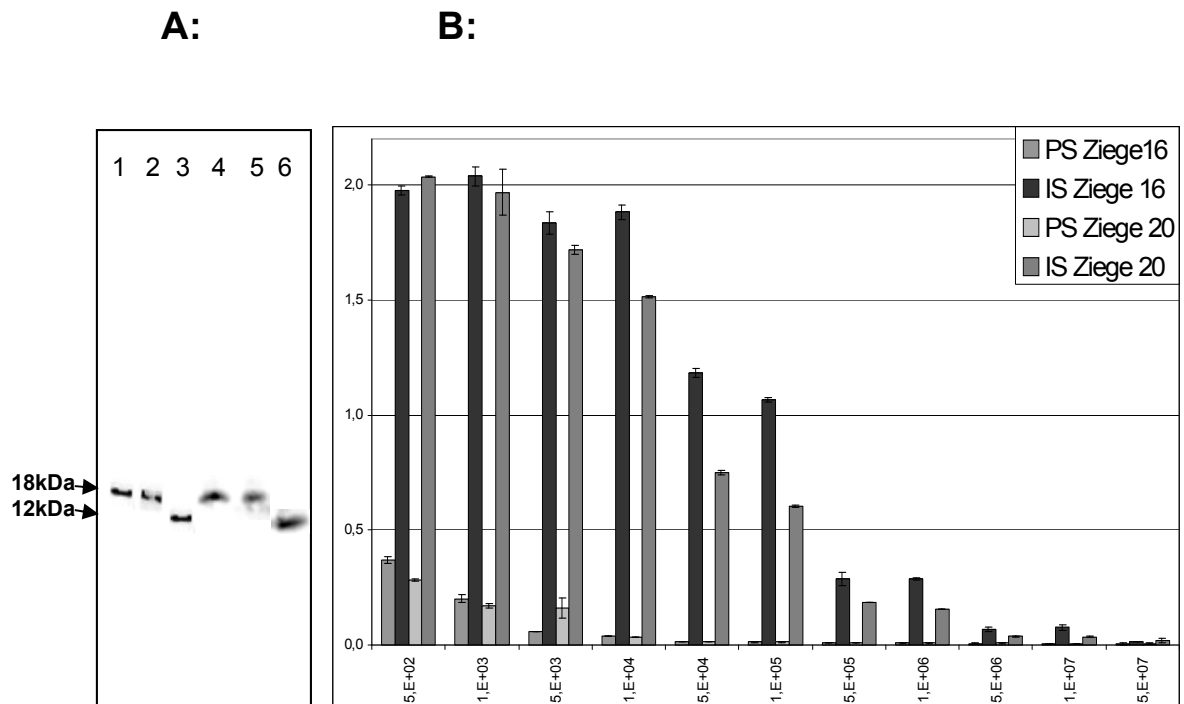


Abb. III.3: Immunchemische Analyse der induzierten PERV-p15E-spezifischen Ziegenserum 16 und 20 gegen virales und rekombinantes p15E

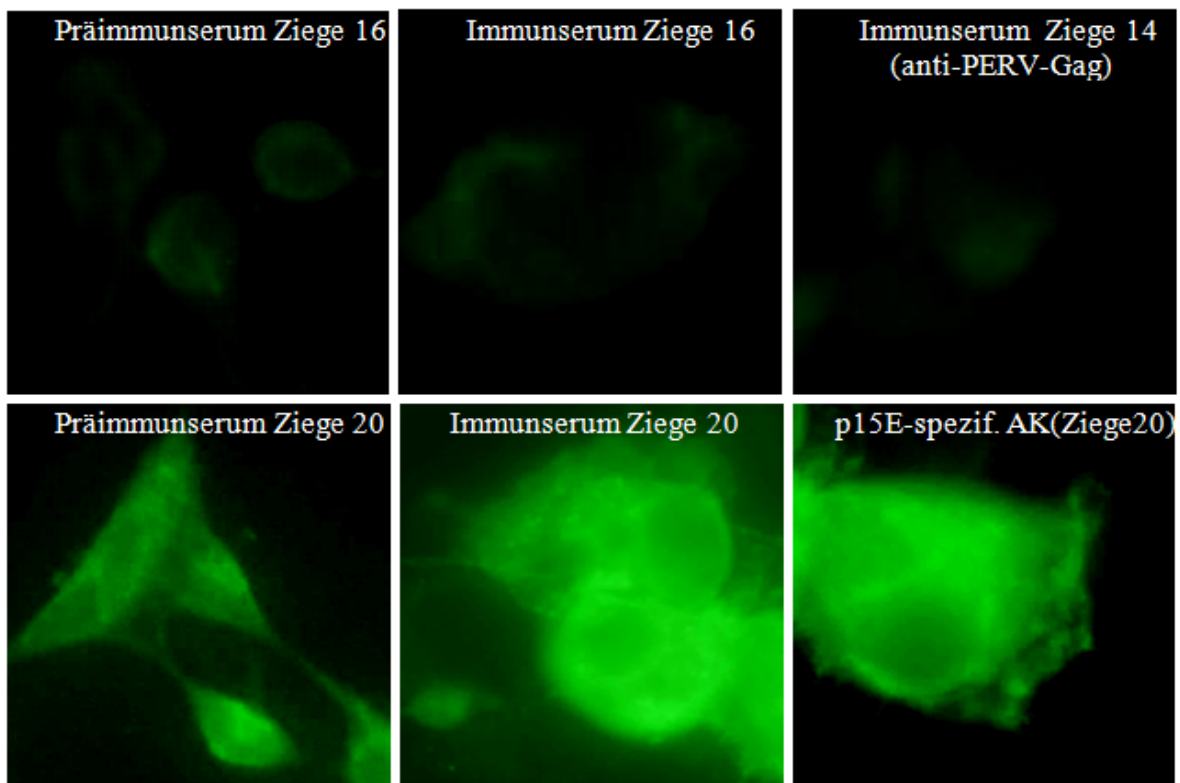
A: Nachweis p15-spezifischer Antikörper durch Western Blot Analyse: im Ziegenserum 20 gegen PERV-A-Viruspräparation (1), gegen affinitätschromatographisch isoliertes virales p15E (2), affinitätschromatographisch gereinigtes rekombinantes rp15E (3); im Ziegenserum 16 gegen PERV-A-Viruspräparation (4), gegen affinitätschromatographisch isoliertes virales p15E (5), affinitätschromatographisch gereinigtes rekombinantes rp15E (6). B: Analyse p15-bindender Antikörper in Präimmunserum (PS) und Immunserum (IS) mittels ELISA in verschiedenen Verdünnungen. Als Antigen wurde rp15E eingesetzt. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurden die Seren durch acetontrocknetes *E. coli*-Pulver adsorbiert. Die Werte wurden als Triplikate gemessen.

Immunfluoreszenz und FACS-Analyse

Zusätzlich wurde die Reaktivität der generierten Seren gegen PERV-5°-infizierte 293-Zellen in der Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) analysiert. Um möglichst native Strukturen zu erhalten, wurden für die Untersuchungen nicht permeabilisierte Zellen verwendet. In beiden Versuchen konnte eine spezifische Bindung der Immunseren an PERV-5°-infizierte Zellen gezeigt werden (Abb. III.4). Die FACS-Analyse zeigte für beide Immunseren eine Bindung p15E-spezifischer Antikörper an ca. 65% der eingesetzten Zellen.

Als Kontrolle wurden die entsprechenden Präimmunseren sowie ein nach gleichem Protokoll generiertes Anti-PERV-Gag-Serum eingesetzt (Ziegenserum 14). Da sich Gag-Proteine ausschließlich im Inneren der Partikel befinden und nicht auf der Virusoberfläche präsentiert werden, sind diese Proteine in nicht permeabilisierten Proben für die Antikörper nicht zugänglich. Folgerichtig konnte hier keine Bindung der anti-Gag-Antikörper an infizierte Zellen detektiert werden. In der FACS-Analyse wurde als zusätzliche Kontrolle ein gegen das TM-Protein von HIV-1 (gp41) induziertes Serum (Ziegenserum 23) eingesetzt. Die Befunde der Immunfluoreszenz konnten in der Durchflusszytometrie zu 100% bestätigt werden. Die Immunseren der Ziegen 16 und 20 binden ca. 65% der infizierten Zellen (Abb. III.4 B).

A:



B:

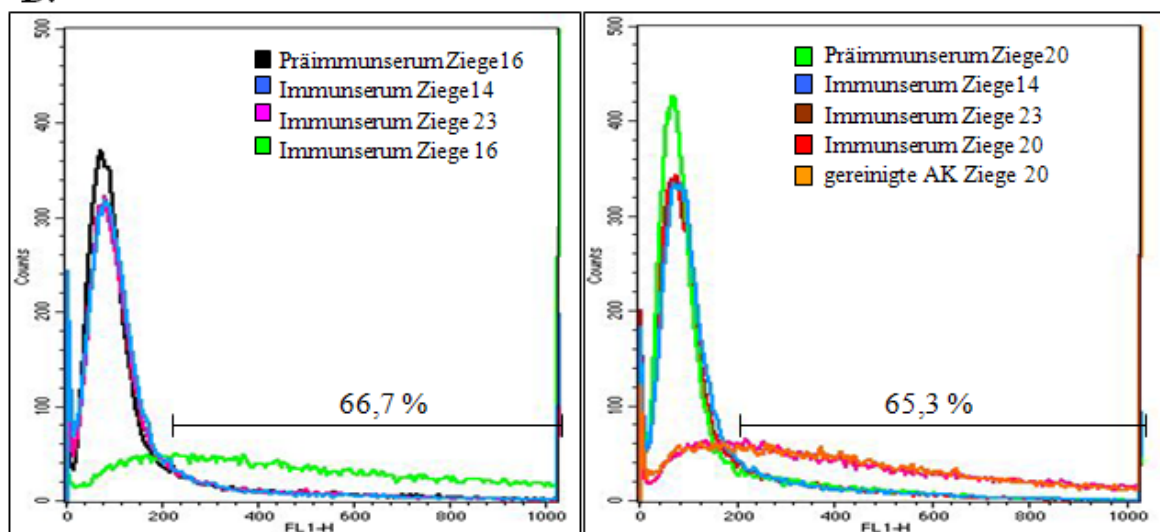


Abb. III.4: Reaktivität der generierten Seren gegen PERV-5°-infizierte 293-Zellen in der Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

A: Immunfluoreszenz auf PERV-5°-infizierten nicht permeabilisierten 293-Zellen (Vergrößerung 1:100). B: FACS-Analyse der Immunseren „Ziege16“ (linke Abb.) und „Ziege20“ (rechte Abb.). Als Kontrollen wurden die entsprechenden Präimmunseren, das anti-Gag-Serum „Ziege14“ und das anti-HIV-1-Serum „Ziege23“ eingesetzt. Zusätzlich zum Immunserum der Ziege20 wurden aus dem Serum (durch Affinitätschromatographie) isolierte p15E-spezifische Antikörper verwendet.

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass die Bindungsstellen der induzierten Antikörper auf der Oberfläche sich abschnürender Viruspartikel zugänglich und nicht durch das Oberflächenprotein maskiert sind.

Epitopkartierung der Ziegenserum 16 und 20

Durch Epitopkartierung sollten einerseits Antikörperbindungsstellen identifiziert, andererseits festgestellt werden, wie viele verschiedene Populationen an p15E-bindenden Antikörper innerhalb der rekombinant generierten Ektodomäne induziert wurden.

Die Epitopkartierung erfolgte mit Hilfe einer PepSpot-Membran™. Durch die Anwendung dieser Methode war es möglich, antigene Strukturen bis auf zwei Aminosäuren genau einzugrenzen.

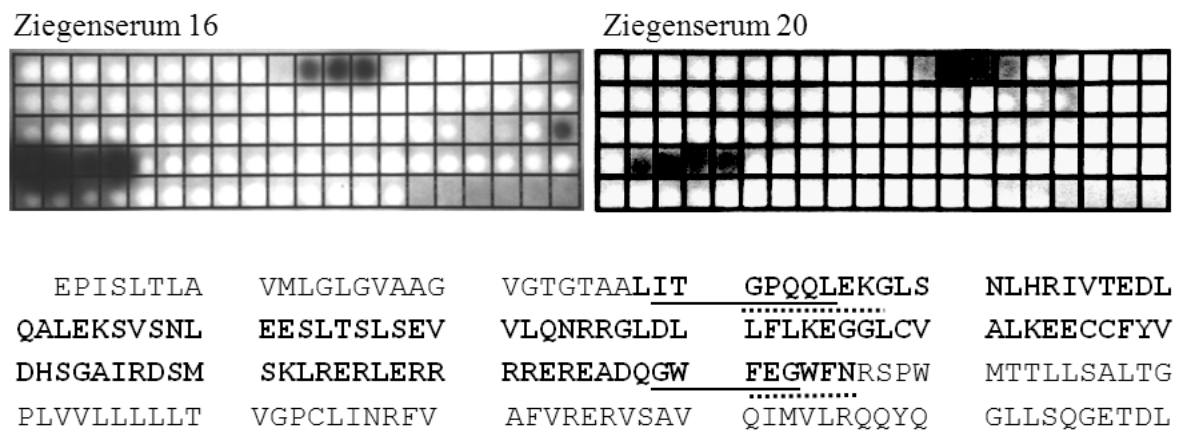


Abb. III.5: Kartierung der Antikörperbindungsstellen innerhalb der Ektodomäne von p15E mittels PepSpot-Membran.

Die Epitopkartierung für das Ziegenserum 20 zeigt die Bindung von Antikörpern an die Sequenzen GPQQLEK und FEGWFN (die Lage im p15E ist durch die unterbrochene Linie gekennzeichnet). Wie im Ziegenserum 20, sind im Ziegenserum 16 Antikörper gegen den C-terminalen (ITGPQQL) und N-terminalen (GWFEF) Bereich der p15E-Ektodomäne enthalten (die Lage im p15E ist durch die durchgehende Linie gekennzeichnet). Die Bindungsstellen der Antikörper beider Seren sind überlappend und um jeweils zwei Aminosäuren gegeneinander verschoben. Unten dargestellt ist die Sequenz des TM-Proteins des PERV-A. Die Sequenz der zur Immunisierung eingesetzten rekombinanten Ektodomäne ist durch Fettdruck hervorgehoben.

Es konnten in beiden Seren Antikörper gegen jeweils zwei Epitope identifiziert werden, eines im C-terminalen und eines im N-terminalen Bereich der Ektodomäne lokalisiert.

Gegen die immundominante Schleife (IDO), gegen die im Verlauf retroviraler Infektionen (z.B. HIV, FeLV) in der Regel hohe Antikörpertiter gebildet werden, wurden keine Antikörper detektiert.

III.1.2 Nachweis PERV-neutralisierender Aktivität in den generierten Seren

Ziel der Immunisierungsversuche war die Induktion PERV-neutralisierender Antikörper. Um zu testen, ob die Immunisierung zweier Ziegen mit rekombinanten p15E zur Induktion PERV-neutralisierender Antikörper geführt hat, wurde ein *in vitro* Neutralisationsassay auf Basis des Nachweises der Provirusintegration durch PCR angewendet.

Für beide Immunseren konnte eine deutliche Hemmung der Provirusintegration nachgewiesen werden. Der Neutralisationstiter der Immunseren wurde aus der Differenz des Titers in Anwesenheit des Präimmunserums und des Immunserums bestimmt. Für das Ziegen Serum 20 beträgt der neutralisierende Titer $1 \times 10^{1,96}$, für die aus dem Ziegen Serum 20 affinitätschromatographisch isolierten p15E-spezifischen Antikörper $1 \times 10^{2,41}$ und für das Serum der Ziege 16 $1 \times 10^{1,69}$. Die angegebenen Neutralisationstiter wurden bei einer Serumverdünnung von 1:10, bzw. in Anwesenheit von 20 µg/ml spezifischer Antikörper bestimmt.

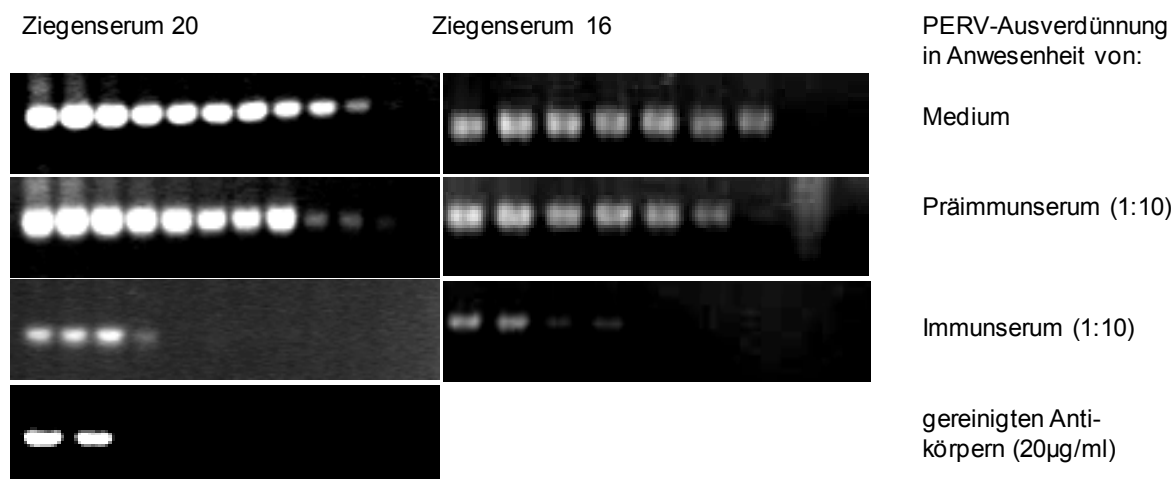


Abb. III.6: *In vitro* Neutralisationsassay zur Bestimmung PERV-neutralisierender Aktivität der generierten Seren.

Ausverdünnung (von links nach rechts 1:2, beginnend mit $1 \times 10^{4,16}$ TCID₅₀) von PERV 5°-Virusüberstand auf 293-Zellen in Anwesenheit von Medium, Präimmunserum, Immunserum und affinitätschromatographisch aufgereinigten Antikörpern (nur aus dem Ziegen Serum 20). Detektiert wurde provirale DNA (mittels PCR). Der Test wurde nach Standardprotoll durchgeführt. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen, jeweils eine Verdünnungsreihe ist hier exemplarisch dargestellt.

III.1.3 Untersuchung der Reaktivität des Ziegenserums 20 gegen synthetische Peptide

Ziel der weiteren Versuche war die genauere Charakterisierung der im Ziegenserum 20 enthaltenen neutralisierenden Antikörper. Dieses Serum zeigte von allen generierten Seren den höchsten Neutralisationstiter (Tab. III.1), die Blutentnahmen erfolgten regelmäßig über einen Zeitraum von zwei Jahren. Das Serum zeigte über den gesamten Zeitraum einen konstant hohen Neutralisationstiter. Ein möglichst hoher Titer von neutralisierenden Antikörpern im Serum über einen langen Zeitraum ist ein wichtiges Kriterium für die Induktion eines effektiven Impfschutzes (Kapitel 4.1).

Durch die Epitopkartierung konnten zwei Sequenzen innerhalb von p15E identifiziert werden, eine im N-terminalen und eine im C-terminalen Bereich der Ektodomäne (Abb. III.5). Durch die weiteren Untersuchungen sollte ermittelt werden, welche der beiden Bindungsstellen ein neutralisationskompetentes Epitop darstellt. Dazu wurden von den Epitopen E1 und E2 abgeleitete Peptide verwendet.

Die Bindungsuntersuchungen im ELISA zeigten, dass die im Serum enthaltenen Antikörper nur relativ schwach an die Einzelpeptide E1 und E2 binden. Auffällig ist die synergistisch gesteigerte Bindung der Antikörper an die Kombination beider Peptide, deutlich über den erwarteten additiven Effekt der Bindung an die beiden Einzelpeptide hinaus (Abb. III.7). Nur durch die kombinierte Adsorption der Peptide E1 und E2 konnte eine ähnlich hohe Absorption wie an rp15E beobachtet werden. Dieser Effekt ließ sich durch die Inkubation in Anwesenheit von Harnstoff noch deutlicher darstellen. Wurde das Serum in Anwesenheit von 2M Harnstoff inkubiert, kann an die einzeln adsorbierten Peptide keine spezifische Bindung mehr detektiert werden, wogegen die Bindung an die Kombination beider Peptide nur um ca. 35% abnimmt.

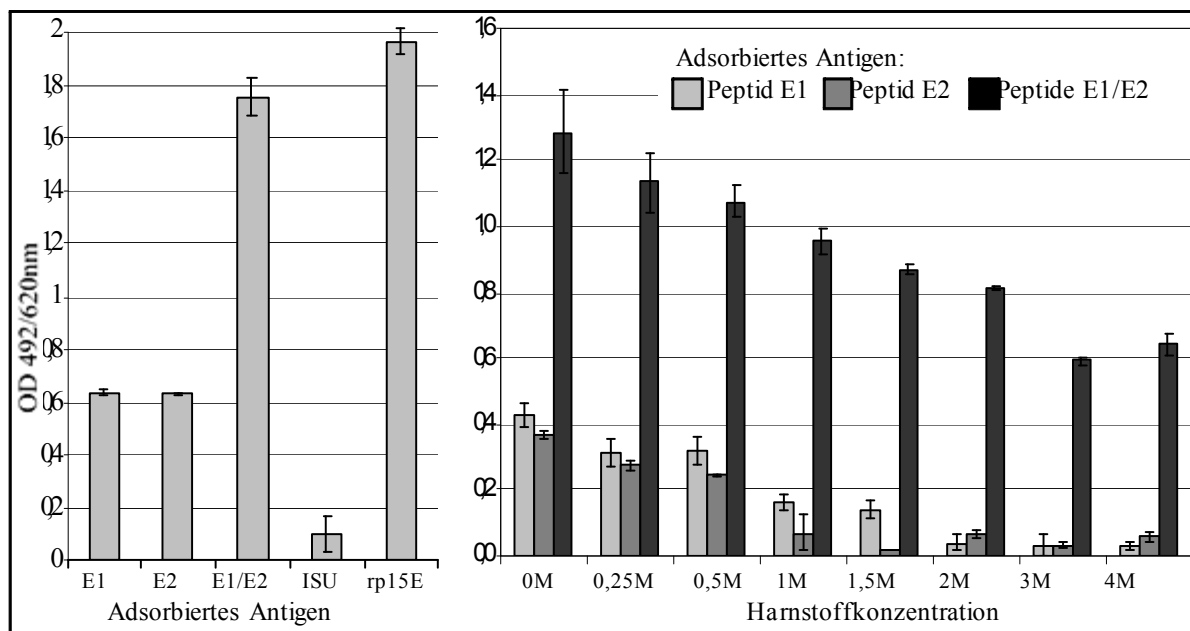


Abb. III.7: : Bindung p15E-spezifischer Antikörper aus dem Ziegenserum 20 an die synthetischen Peptide PERV-E1 und -E2 im ELISA.

Linker Graph: Bindung an die Einzelpeptide, an die Kombination der Peptide E1 und E2, an das ISU Peptid (Kontrollpeptid) und an rekombinantes p15E. Die Kombination beider Peptide hatte eine deutlich gesteigerte Bindung der im Ziegenserum 20 enthaltenen p15E spezifischen Antikörper zur Folge. Ein additiver Effekt wurde dabei durch die Kombination beider Antigene deutlich übertroffen. Rechter Graph: Inkubation des Serums in Gegenwart verschiedener Harnstoffkonzentrationen mit E1, E2 und auf den zusammen adsorbierten Peptiden E1+E2. Die synergistisch gesteigerte Bindung der p15E-spezifischen Antikörper an die Kombination der Antigene, konnte bei höheren Harnstoffkonzentrationen noch deutlicher dargestellt werden.

Um die möglicherweise die zwei im Ziegenserum 20 enthaltenene Antikörperpopulationen zu trennen, wurden die von den identifizierten Epitopen abgeleiteten Peptide E1 und E2 an Sepharose gekoppelt und eine Säule zur Affinitätschromatographischen Trennung hergestellt. Um den Erfolg der Kopplung zu überprüfen, wurden geringe Mengen des Säulenmaterials in SDS-Probenpuffer aufgekocht und durch SDS-PAGE analysiert. Als Vergleich wurde eine rp15E-gekoppelte Sepharose herangezogen, mit der bereits in vorangegangenen Versuchen größere Mengen spezifischer Antikörper isoliert werden konnten. Für alle drei Kopplungen konnte eine annähernd identisch hohe Kopplungseffizienz nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

Durch die Affinitätschromatographie des Immunserums der Ziege 20 konnte keine Trennung möglicher Antikörperpopulationen erreicht werden. Von beiden Säulen konnten nur relativ geringe Antikörpermengen eluiert werden. Die eluierte Proteinmenge aller Fraktionen betrug

jeweils ca. 400µg. Aus dem gleichen Volumen konnten in vorhergehenden Versuchen ca. 7mg p15E-spezifische Antikörper isoliert werden. Die Eluate beider Säulen unterschieden sich nicht in ihrer Reaktivität untereinander und zum Ausgangsmaterial (Abb. III.8). Der Versuch zeigt, dass durch Affinitätschromatographie keine Trennung verschiedener Antikörperpopulationen erreicht werden konnte.

Die schwach affine Bindung E1/E2-spezifischer Antikörper an die Einzelpeptide wurde bereits in den ELISA-Bindungsstudien beobachtet. Die Daten dieses Versuches bestätigen die in Abb. 3.7 dargestellten Daten der Bindungsstudien.

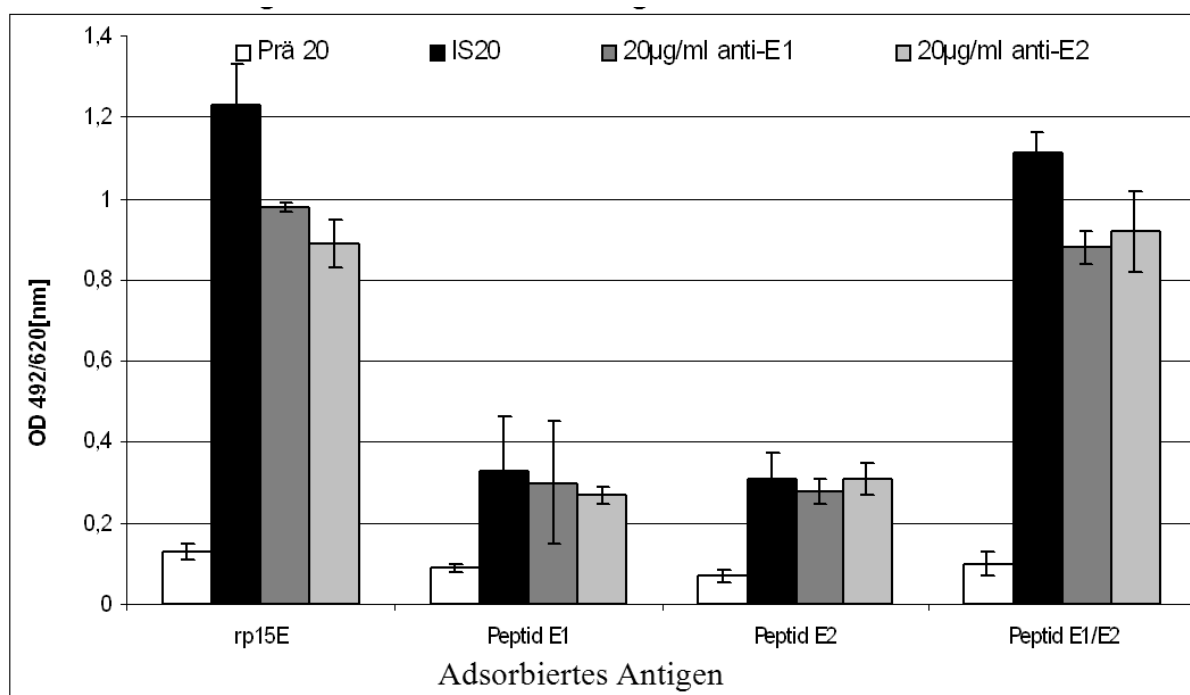


Abb. III.8: Affinitätschromatographische Trennung E1- und E2-spezifischer Antikörper.

Die eluierten Antikörper von der E1-Säule (anti-E1) und der E2 Säule (anti-E2) wurden im ELISA auf ihre Spezifität gegen rekombinantes p15E (rp15E) und die synthetischen Peptide E1/E2 untersucht. Verglichen wurde mit dem Präimmunserum (Prä20) und dem Immunserum der Ziege 20 (IS20), das als Ausgangsmaterial verwendet wurde.

III.1.4 Hemmung der neutralisierenden Aktivität durch rp15E und synthetische Peptide

In ELISA-Bindungsstudien konnte eine Interaktion zwischen den synthetischen Peptide E1 und E2 gezeigt werden. Im Vergleich zu den Einzelpeptiden führte die kombinierte Adsorption beider Peptide an die polymere Matrix der ELISA-Platten zu einer synergistischen Bindung des Ziegenserums 20 (Abb. III.7). Die Interaktion beider Peptide ist ein Hinweis auf die Bildung eines Konformationsepitops.

Durch diesen Versuch sollte untersucht werden, ob sich der im ELISA beobachtete Effekt auch in einem *in vitro*-Neutralisationsassay darstellen lässt. Je nach Neutralisationskompetenz der identifizierten Epitope, sollte die neutralisierende Aktivität der im Serum enthaltenen Antikörper durch die Zugabe von rp15E, Peptid E1, Peptid E2 sowie durch die Kombination beider Peptide verschieden stark gehemmt werden.

Durch diesen Versuch sollten drei wesentliche Fragestellungen untersucht werden:

1. Die Hemmung der PERV-Neutralisation durch rp15E und von den identifizierten Epitopen abgeleitete Peptide sollte sicherstellen, dass die Neutralisation auf p15E-spezifische Antikörper zurückzuführen ist. Die Hemmung der Provirusintegration wurde in vorhergehenden Versuchen für dekomplementiertes Immunserum sowie für affinitätschromatographisch gereinigte Antikörper gezeigt. Lässt sich dieser Effekt durch die Zugabe des zur Immunisierung eingesetzten Antigens (rp15E) bzw. durch die von den Epitopen abgeleiteten Peptide, (E1/E2) aufheben, kann die Anwesenheit unspezifischer virusinhibierender Faktoren, wie z.B. Zytokine, ausgeschlossen werden.
2. Wie viele Antikörperpopulationen wurden durch die Immunisierung mit rp15E induziert und kann die neutralisierende Aktivität einem E1- bzw. E2-spezifischen Antikörper zugewiesen werden? Können durch die Epitopkartierung die Bindungsstellen aller im Serum enthaltenen Antikörper dargestellt werden? Ist die Neutralisation ausschließlich auf die Bindung an die den N-terminalen (E1) bzw. an den C-terminalen (E2) Bereich zurückzuführen, sollte die gehemmte TCID50 durch die Peptide der durch rp15E entsprechen.
3. Lässt sich der im ELISA beobachtete synergistische Effekt auch in einem *in vitro* Neutralisationsassay darstellen? Aus einer synergistischen Bindung der Peptide an die im Serum enthaltenen Antikörper sollte eine synergistisch gesteigerte Hemmung der PERV-neutralisierenden Wirkung des Immunserums resultieren.

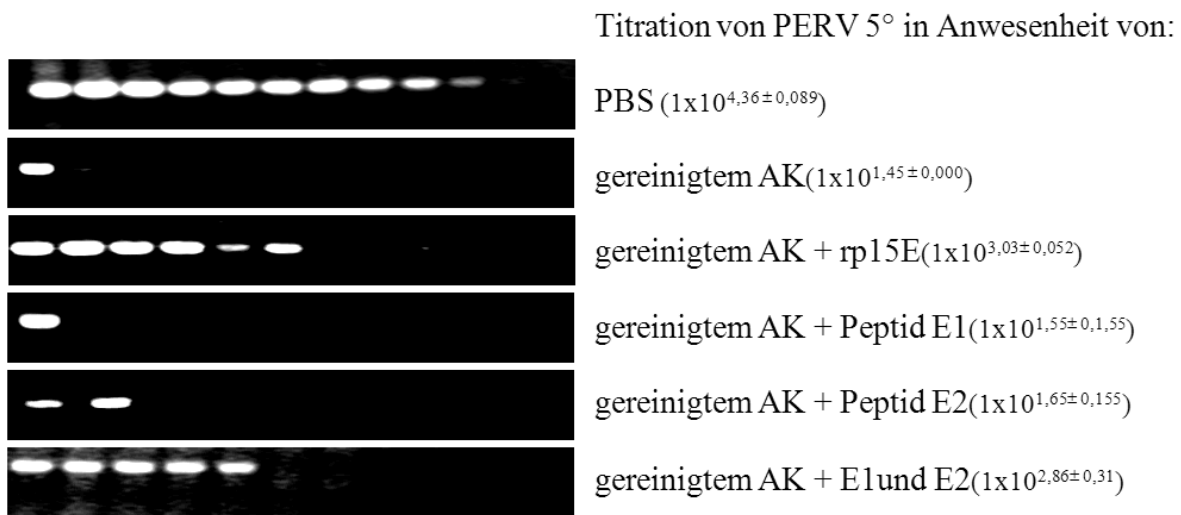


Abb. III.9: Hemmung der PERV-neutralisierenden Aktivität des Ziegenserums 20 durch rp15E und die synthetischen Peptide E1 und E2 im *in vitro*-Neutralisationsassay.

Die Hemmung der PERV-Provirusintegration kann nur durch das zur Immunisierung eingesetzte rp15E und die Kombination der synthetischen Peptide E1 und E2 aufgehoben werden. Die Zugabe der Einzelpeptide hat keinen (E1) bzw. nur einen geringen Effekt (E2). Die Peptide und rp15E wurden im gleichen molaren Verhältnis eingesetzt. Die Berechnung der TCID50 und der Standardabweichungen (in Klammer angegeben) erfolgte aus drei Einzelwerten.

Die neutralisierende Wirkung des Ziegenserums 20 konnte durch die Zugabe von rp15E deutlich gehemmt werden. Eine vollständige Aufhebung wurde weder durch rp15E noch durch die synthetischen Peptide beobachtet. Peptide (0,8µg/ml) und rp15E (8µg/ml) wurden in einem molaren Überschuss von 4:1 zum Antikörper (20µg/ml) eingesetzt. Das entspricht einem Antigen-Paratop-Verhältnis von 2:1, da ein Antikörper über zwei identische Paratope verfügt. Möglicherweise kann die Hemmung der Neutralisation durch größere Antigenmengen und eine Vorinkubation der Antikörper mit dem Antigen bis zur vollständigen Aufhebung der Neutralisation verstärkt werden.

Durch die Zugabe der Einzelpeptide wurde keine signifikante Hemmung der Neutralisation beobachtet. Bei Kombination beider Peptide konnte, korrelierend zu den Befunden der ELISA-Bindungsstudien, eine synergistische Hemmung festgestellt werden. Die Hemmung der PERV-Neutralisation des Serums durch die Kombination der Peptide E1/E2, entspricht annähernd der Hemmung durch rp15. Die TCID50-Werte sind mit Standardabweichung in Abb. 3.9 dargestellt.

III.1.5 Einfluss der Vorinkubation auf die Virusneutralisation

Die Daten der ELISA-Bindungsstudien (Abb. III.7) und des *in vitro* Neutralisationsassays (Abb. III.9) suggerieren die Bildung eines Konformationsepitops. Strukturmodelle des transmembranen Hüllprotein von HIV-1 (gp41) postulierten während des Infektionsvorgangs ein Klappmechanismus, durch den sich die beiden Helices zusammenlagern (Binley und Moore, 1997) und so die Annäherung der Wirtszellmembran zur viralen Membran vermitteln. Die an diesem Vorgang beteiligten Bereiche wiesen große strukturelle Homologien zu den transmembranen Hüllproteinen anderer Retroviren auf (z.B. FeLV, MuLV, PERV), so dass auch für das Transmembranhüllprotein von PERV eine offene Konformation im nativen Zustand angenommen wurde, die sich während des Infektionsvorganges zu einem Sechshelix-Bündel ausbildet. Von diesem Modell ausgehend, ist die Interaktion der Bereiche E1 und E2 zu einem Konformationsepitop erst während des Infektionsvorgangs möglich.

Die in dieser Arbeit durchgeführten FACS-Analysen und Immunfluoreszenz zeigten eine Bindung der Antikörper an sich abschnürende Viruspartikel (siehe 3.1.1.). Diese Daten weisen auf die Zugänglichkeit zumindest einer Antikörperbindungsstelle im nativen Virus hin. Wenn die induzierten PERV-neutralisierenden Antikörper das native Virus binden, wäre eine gesteigerte Neutralisation durch die Vorinkubation des Virus mit dem Ziegenserum 20 in Abwesenheit der Wirtszellen zu erwarten.

Der Versuch zeigte, dass die Vorinkubation keinen Einfluss auf das neutralisierende Potential des Ziegenserums 20 hatte. Der leichte Abfall der Provirusintegration mit länger andauernder Vorinkubation ist auch im Kontrollansatz (Vorinkubation mit Präimmunsrum) zu beobachten und war damit nicht auf mehr spezifische Bindungen neutralisierender Antikörper an p15E zurückzuführen. Möglicherweise lag die Ursache hierfür in der äußerst schwachen affinen Bindung der Antikörper an die Einzelepitope.

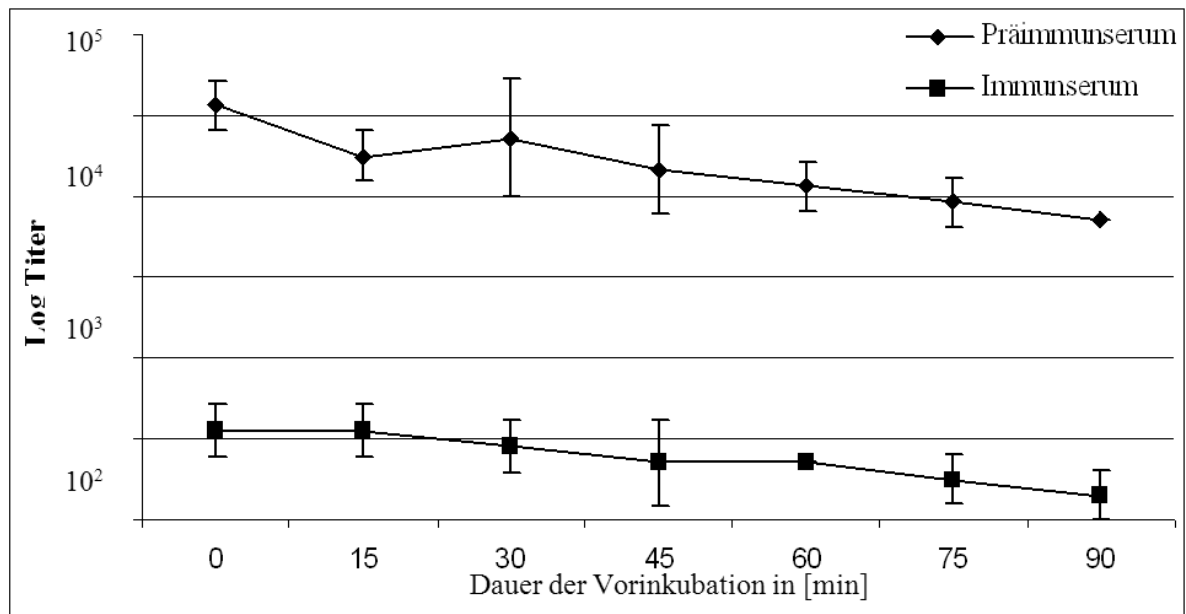


Abb. III.10: Einfluss der Vorinkubation der PERV-Überstände mit Präimmun- und Immunserum der Ziege 20.

Die Virusüberstände und das Immunserum der Ziege 20 (1:10) wurden bei 37°C im Zellkulturbrutschrank in Abwesenheit der Wirtszellen vorinkubiert. Es ist keine signifikante Steigerung der PERV-Neutralisation nach Vorinkubation zu beobachten. Alle Werte wurden im *in vitro* Neutralisationsassay als Triplikate mittels PCR bestimmt.

III.1.6 Immunisierung von Ratten mit rekombinanten p15E

Durch die Immunisierung mit rekombinant hergestellten p15E konnten PERV-neutralisierende Antikörper in zwei Ziegen induziert werden. In beiden Immunseren konnten Antikörper gegen den C-terminalen sowie den N-terminalen Bereich der Ektodomäne identifiziert werden (3.1.2.). Die Untersuchung des Ziegenserums 20 ergab, dass es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein neutralisierendes Konformationsepitop handelt, das von diesen beiden Bereichen während des Infektionsvorgangs gebildet wird.

Um diese Daten in einem anderen Tiermodell zu reproduzieren, wurden neun Wistar-Ratten mit dem gleichen Antigen immunisiert. Alle Tiere bildeten bereits nach der ersten Immunisierung hohe Titer an bindenden Antikörpern, die sich durch die Auffrischung (Boost) nach drei Wochen nur wenig erhöhten (Abb. III.11).

Ein effektiver Schutz vor einer möglichen Infektion setzt eine möglichst 100%ige Effektivität des eingesetzten Impfstoffes voraus. Alle gegen rp15E immunisierten Ratten bildeten hohe Titer an p15E-spezifischen Antikörpern. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Seren ebenfalls PERV-neutralisierende Aktivität besitzen.

Die Präimmun- und Immunseren aller Versuchstiere wurden im *in vitro* Neutralisationsassay getestet. In allen Seren konnte PERV-neutralisierende Aktivität detektiert werden (Tab. III.1). Die Neutralisationstiter wurden aus der Differenz der Immunseren zu den jeweiligen Präimmunseren errechnet.

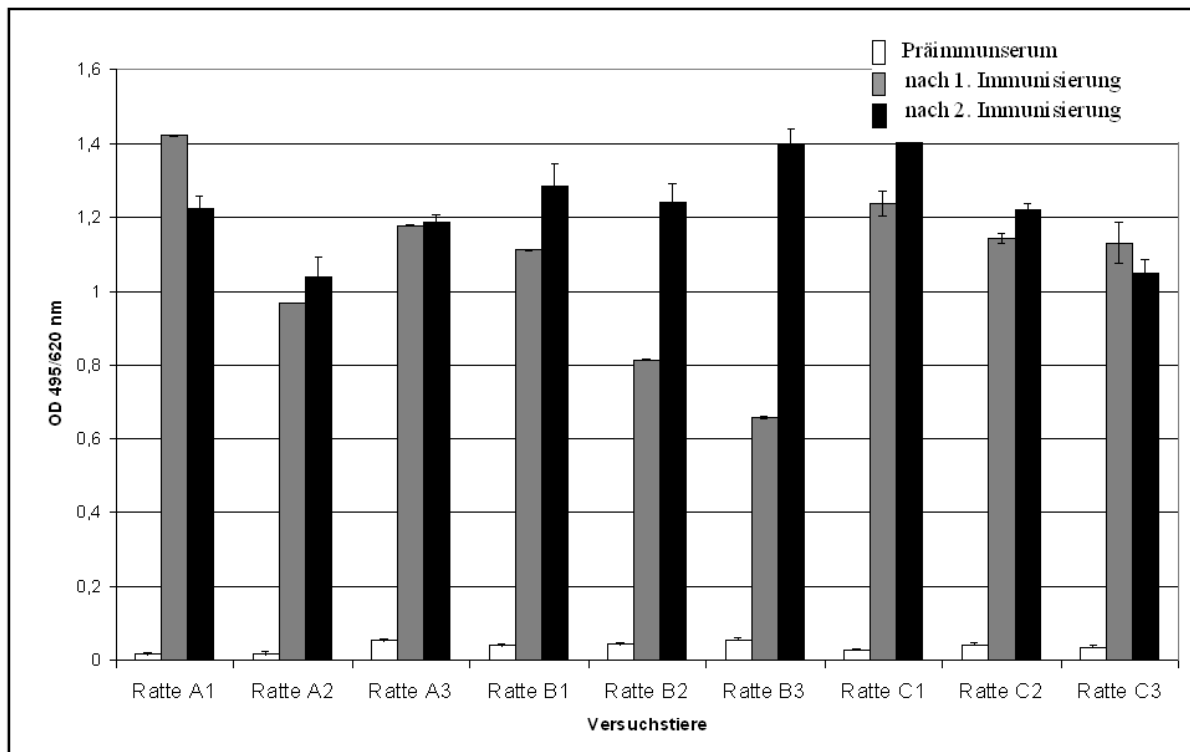


Abb. III.11: Nachweis p15-spezifischer Antikörper im ELISA

Alle Ratten bildeten bereits nach der ersten Immunisierung mit rp15E hohe Titer an bindenden Antikörpern. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen.

Tab. III.1: Neutralisationstiter der PERV-spezifischen Seren:

Versuchstier	Antigen	Neutralisationstiter	Versuchstier	Antigen	Neutralisationstiter
Ziege 20	p15E(rekombinant)	$1 \times 10^{1,96}$	Ziege 14	Gag(rekombinant)	-
Ziege 16	p15E(rekombinant)	$1 \times 10^{1,69}$	Ziege 18	Gag(rekombinant)	-
Ratte A1	p15E(rekombinant)	$1 \times 10^{1,36}$	Ratte D1	ISU-Peptid-Dex6	-
Ratte A2	p15E(rekombinant)	$1 \times 10^{1,36}$	Ratte D2	ISU-Peptid-Dex6	-
Ratte A3	p15E(rekombinant)	$1 \times 10^{1,51}$	Ratte D3	ISU-Peptid-Dex6	-
Ratte B1	p15E(rekombinant)	$1 \times 10^{1,21}$	Kaninchen 2	ISU-Peptid-KLH	-
Ratte B2	p15E(rekombinant)	$1 \times 10^{1,21}$	Kaninchen 3	ISU-Peptid-KLH	-
Ratte B3	p15E(rekombinant)	$1 \times 10^{1,36}$	Kaninchen 4	IDO-Peptid-KLH	-
Ratte C1	p15E(rekombinant)	$1 \times 10^{1,36}$	Kaninchen 5	IDO-Peptid-KLH	-
Ratte C2	p15E(rekombinant)	$1 \times 10^{1,21}$	Kaninchen 6	p27Gag (Virus)	-
Ratte C3	p15E(rekombinant)	$1 \times 10^{1,21}$			-

Zur Induktion von PERV-spezifischen Antikörpern wurden verschiedene, aus dem Virus isolierte, abgeleitete Peptide oder rekombinant hergestellte Antigene verwendet. Neutralisierende Aktivität konnte nur in Seren festgestellt werden, die gegen rekombinantes p15E erzeugt wurden. Die Neutralisationstiter dieser Seren sind in Abbildung 3.12 vergleichend gegenübergestellt. In der Tabelle sind alle generierten PERV-spezifischen Seren zusammengefasst. In Seren gegen das Gag p27 oder gegen von p15E abgeleitete Peptide konnten keine PERV-neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden.

Epitopkartierung rp15E-spezifischer Rattenserum:

Analog zu den Immunseren der Ziegen sollte auch für die generierten Rattenserum eine Epitopkartierung durchgeführt werden. Für beide Ziegenserum konnten annähernd identische Antikörperbindungsstellen in der p15E-Ektodomäne identifiziert werden.

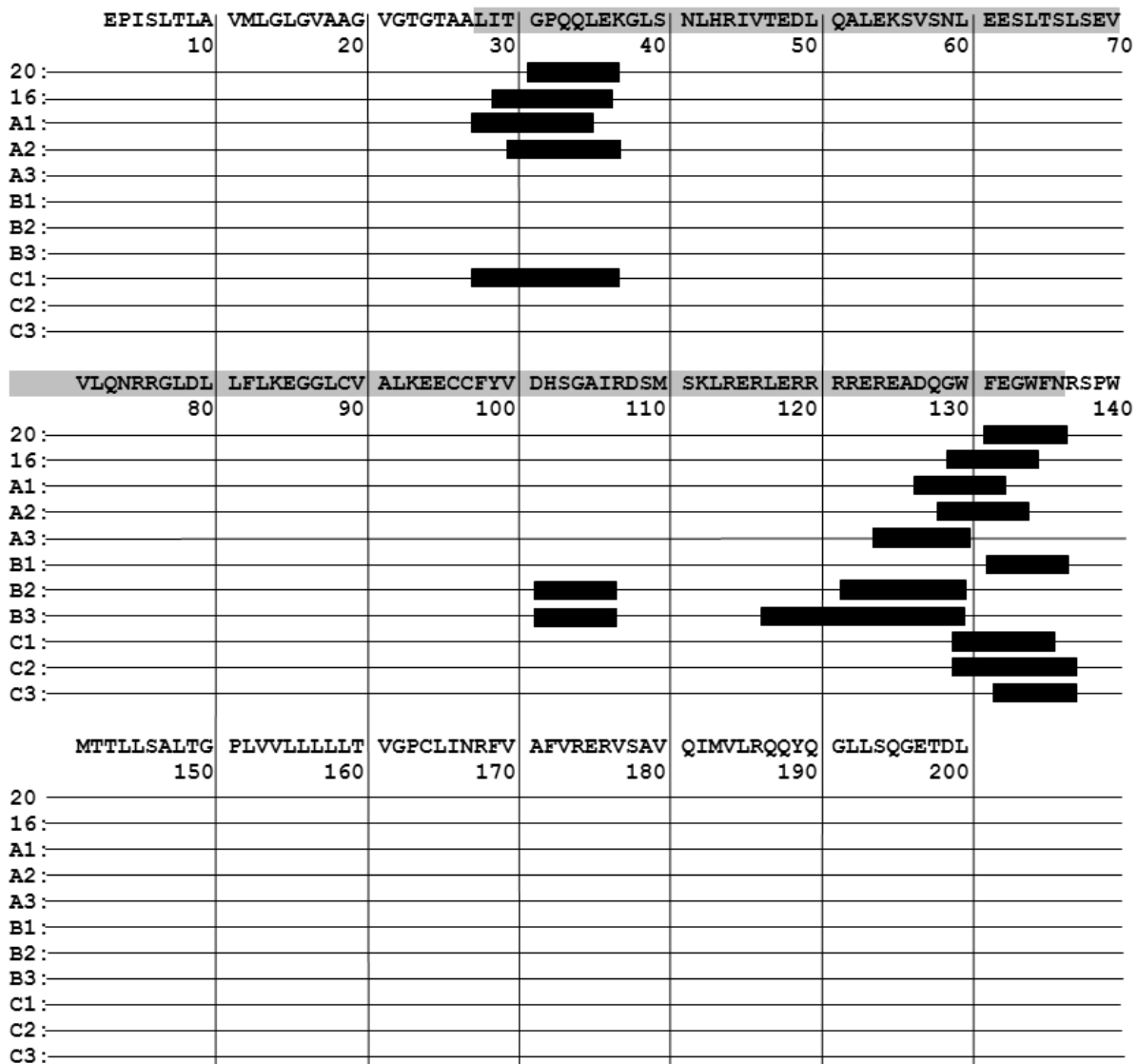


Abb. III.12: Epitopkartierung PERV-neutralisierender Seren (Ziegenserum 16 und 20, Wistar-Ratten Gruppe A-C).

Dargestellt ist die gesamte Sequenz des TM-Proteins, grau unterlegt die Sequenz der zur Immunisierung eingesetzten Ektodomäne (rp15E). Die von den einzelnen Seren gebundenen Sequenzen sind mit schwarzen Balken gekennzeichnet. Es wurde eine PepSpot-Membran (Jerini Biotools, Berlin) verwendet.

In allen Seren konnten Antikörper gegen den membranproximalen Bereich der Ektodomäne detektiert werden (E2-Epitop). Wobei die Epitope in einem Bereich von ca. 15 Aminosäuren von C-Terminus lokalisiert sind (AS121-136). Im N-terminalen Bereich konnten nur für fünf von insgesamt elf Immunseren Epitope identifiziert werden.

III.1.7 Immunisierung von Ratten mit PERV-E1 und -E2 abgeleiteten Peptiden

Die Verwendung von Peptidvakzinen kann entscheidende Vorteile haben. Besonders bei in Bakterien produzierten Proteinen kann die Abreicherung von unerwünschten Nebenprodukten, wie z.B. Lipopolysacchariden, aufwändig und teuer sein. Durch das Angebot einzelner, neutralisierender Sequenzen könnte die Effektivität einer Immunisierung erhöht werden. In den ELISA-Studien und im *in vitro*-Neutralisationsassay konnte eine Interaktion der Peptide PERV-E1 und -E2 mit den neutralisierenden Antikörpern aus dem Ziegenserum 20 gezeigt werden. Auch der Versuch der affinitätschromatographischen Trennung möglicher Antikörperpopulationen wies auf die Bildung eines Konformationsepitops hin. Ziel des Versuches war die Nachbildung dieses diskontinuierlichen Epitops durch abgeleitete Peptide. Dazu wurden die Peptide an verschiedene Träger wie BSA, KLH oder Dextran gekoppelt. Um eine möglichst variable Ausrichtungen der Peptide zu ermöglichen, wurden verschiedene Kopplungsmethoden verwendet. Alternativ zur Kopplung an Trägermoleküle wurde mit über Cysteinbrücken gebildeten Di- bzw. Trimeren immunisiert. Für diese Versuche wurden 15mere bzw. 25mere Peptide eingesetzt (Tab. III.2)

Tab. III.2: Immunisierung von Wistar-Ratten mit von den identifizierten Epitopen (PERV-E1 u. PERV-E2) abgeleiteten synthetischen Peptiden.

Antigen/Kopplungsmethode	Anzahl der Tiere	bindende AK		Neutra- lisation
		E1	E2	
1. freie Peptide PERV-E1/E2 (synthetisch hergestellte 15mere, enthalten die identifizierten Epitopen PERV E1 und E2)	6	-	+	-
2. Peptid PERV-E1/E2-BSA (Peptide wie 1.)	3	-	-	-
3. Peptid PERV-E1/E2-KLH (Peptide wie 1.)	3	-	-	-
4. Peptid PERV-E1-Dex6 (Peptide wie 1./Kopplung über NH ₂ -Gruppen an aktiviertes Dextran (6kDa))	3	++	-	-
5. Peptid PERV-E2-Dex6 (Peptide wie 1./Kopplung wie 4.)	3	-	+++	-
6. Peptid PERV-E1/E2-Dex6 (Peptide wie 1./Kopplung wie 4.)	3	+	++	-
7. Peptid PERV-E1/E2-Dex6 (Peptide wie 1./Kopplung über den ifunktionalen PDPH-Linker an Dextran (6kDa))	3	+	++	-
8. Peptide PERV-Cys-E1/2 (Vernetzung von 25meren zu Di- und Trimeren über eingefügte Cysteine)	6	++	++	-

Zur Generation der Antigene wurden 15mere (PERV-E1/E2) bzw. 25mere (PERV-E1/E2-Cys) verwendet. Die Kopplung erfolgte an BSA (Bovine Serum Albumin), KLH (keyhole limpet hemocyanin) oder an aktiviertes Dextran (MW: 6kDa). Die Immunisierung mit BSA oder KLH-Peptidkonjugaten induzierte keine im ELISA messbaren Antikörpertiter. Während durch die Immunisierung mit Dextran-Peptid-Konjugaten relativ hohe Titer an bindenden Antikörpern induziert wurden, konnte in keinem der generierten Seren PERV-hemmende Aktivität nachgewiesen werden

III.1.8 Test auf Kreuzneutralisation

An ein effektives Vakzin wird die Anforderung gestellt, Schutz gegen möglichst alle Subtypen des Erregers zu induzieren. Derzeit sind drei Subtypen (PERV A, B und C) des porzinen endogenen Retrovirus beschrieben. Nur die Subtypen A und B können humane Zellen infizieren. Die identifizierten Epitope E1 und E2 sind bei allen drei PERV-Subtypen stark konserviert (Tab. IV.1). Im *in vivo*-Neutralisationsassay konnte gezeigt werden, dass alle PERV-A neutralisierenden Seren auch den Subtyp B neutralisieren (Tab. III.3).

Besonders der membranproximale E2-Bereich ist bei allen Retroviren relativ stark konserviert, dagegen gibt es im E1-Bereich starke Abweichungen (Tab. IV.1). In vorangegangenen Versuchen konnte eine Interaktion zwischen dem E1 und E2-Bereich gezeigt werden. Seren, die ausschließlich gegen den E2-Bereich induziert wurden, sind nicht neutralisierend. Erwartungsgemäß wurden verwandte, in der E1-Sequenz stark abweichende Retroviren durch PERV-p15E spezifische Seren nicht neutralisiert.

Gleichzeitig konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass es sich bei der replikationshemmenden Aktivität der induzierten Seren um eine PERV-spezifische Neutralisation handelt.

Tab. III.3: Test PERV-A neutralisierender Seren auf Kreuzreaktivität gegen den PERV-Subtyp B, FeLV-A, Mo-MuLV und HIV-1 IIIB.

	PERV-B	FeLV-A	Mo-MuLV	HIV-1 IIIB
Ziege 20	$1 \times 10^{1,83}$	-	-	-
Ziege 16	$1 \times 10^{1,74}$	-	-	-
Ratte A1	$1 \times 10^{1,32}$	-	-	-
Ratte A2	$1 \times 10^{1,32}$	-	-	-
Ratte A3	$1 \times 10^{1,47}$	-	-	-
Ratte B1	$1 \times 10^{1,21}$	-	-	-
Ratte B2	$1 \times 10^{1,35}$	-	-	-
Ratte B3	$1 \times 10^{1,43}$	-	-	-
Ratte C1	$1 \times 10^{1,36}$	-	-	-
Ratte C2	$1 \times 10^{1,27}$	-	-	-
Ratte C3	$1 \times 10^{1,27}$	-	-	-

Nur PERV-B wurde durch die induzierten Seren neutralisiert. Die engverwandten Gammaretroviren FeLV und MuLV wurden trotz hoher Sequenzhomologie im E2-Bereich nicht neutralisiert. Auch gegen das Lentivirus HIV-1 konnte keine virushemmende Aktivität detektiert werden.

III.2 Entwicklung eines Realtime-PCR-Assays zum Nachweis der PERV-Provirusintegration

Für den Nachweis der PERV-Provirusintegration wurde ein Neutralisationsassay auf Basis einer Endpunktbestimmung etabliert. Der Nachweis proviraler DNA erfolgte durch PCR. Dazu wurden die Zellen nach der Infektion mehrmals passagiert um eine ausreichende Anreicherung proviraler DNA zu gewährleisten. Zur Quantifizierung der hemmenden Wirkung der Immunseren wurden in Anwesenheit konstanter Serummengen die Virusüberstände titriert. Dieses Verfahren erforderte große Mengen an Probenmaterial und aufwändige Zellkulturarbeiten.

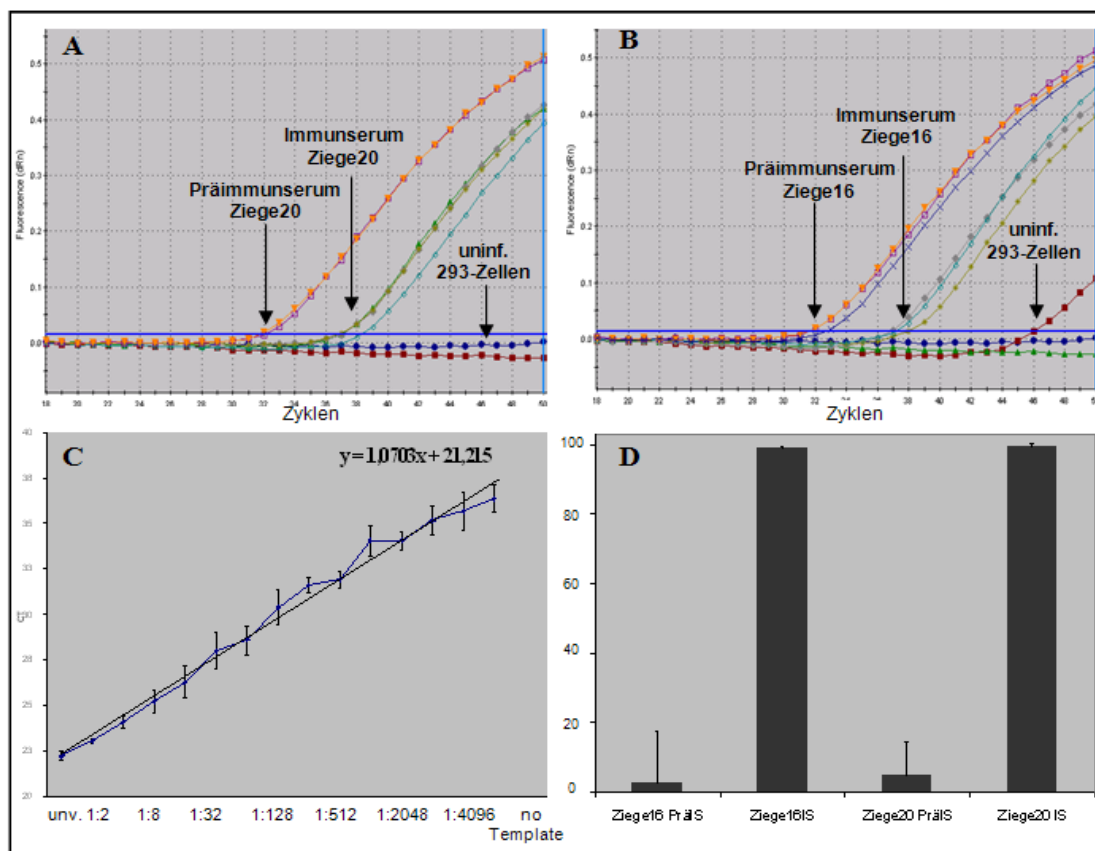


Abb. III.13: Entwicklung eines Realtime-PCR-Assays zum quantitativen Nachweis der PERV-Provirusintegration.

Nachweis verminderter PERV-Provirusintegration durch Zugabe der Immunseren der Ziege 20 (Abb. A) und Ziege 16 (Abb. B). Als Kontrollen wurden Präimmunserum und uninfectierte 293-Zellen mitgeführt. Um die Hemmung quantifizieren zu können, wurde das Zelllysate infizierter Zellen (ca. 2×10^3 Zellen) auf dem Lysat uninfectierter Zellen (no Template) ausverdünnung. In diesem Versuch konnte bis zu einer Verdünnung von 1: 8192 ein spezifisches Signal detektiert werden. Das entspricht 0,25 Zellen im Reaktionsansatz. Der Anstieg des Graphen beträgt 1,0703, das entspricht annähernd einer 100%igen Effizienz ($n=1$) der PCR (Abb.C). Mit Hilfe des ermittelten Korrekturfaktors (Abb.C) kann die beobachtete Hemmung der Virusreplikation durch Zugabe des Immunserums (Abb. A und B) in Prozent dargestellt werden (Abb.D). Alle Werte wurden als Triplikate gemessen. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt.

Die Detektion erfolgte durch PCR, wobei Triplikat-Messungen 36 Reaktionsansätze pro Serumprobe erforderten. Dieses Verfahren erwies sich, aufgrund der aufwändigen Zellkulturarbeiten als sehr zeit- und kostenintensiv und verhindert so einen hohen Probendurchsatz. Deshalb wurde zur Vereinfachung des Verfahrens ein Realtime-PCR-Assay etabliert. Die Quantifizierung proviraler DNA ist damit bereits 72 Stunden nach der Infektion möglich, das Passagieren der Zellen entfällt und pro Serumprobe sind nur noch drei Reaktionsansätze notwendig. Grundlage der Quantifizierung der neutralisierenden Wirkung eines Immunsersums im Vergleich zum entsprechenden Präimmunsersum, ist die Verschiebung des ct-Wertes.

III.3 Induktion HIV-neutralisierender Antikörper

Die Versuche zur Induktion PERV-neutralisierender Antikörper zeigen, dass das transmembrane Hüllprotein von Retroviren generell zur Induktion neutralisierender Antikörper geeignet ist. Besonders die Isolation breitneutralisierender, gp41-spezifischer Antikörper aus HIV-Patienten (2F5 und 4E10) stützt diese These. Diese Antikörper binden den gleichen membranproximalen Bereich der Ektodomäne wie die durch rp15E induzierten PERV-neutralisierenden Antikörper. Die Übertragung der Erkenntnisse zum Neutralisationsmechanismus PERV-neutralisierender Antikörper, sowie die genaue Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers 2F5 könnte die Basis für die Generation neuer Impfkonstrukte sein.

III.3.1 Immunisierung von Ratten mit rekombinanten gp41

Analog zur Immunisierung gegen PERV-p15E wurde die Ektodomäne des TM-Proteins des HIV-1 gp41 rekombinant generiert und zur Immunisierung eingesetzt (Wistar-Ratten N1-3 und M2). Dieses Konstrukt wird im Folgenden CBP-rgp41 genannt. Das Expressionsprodukt präzipitierte in wässriger Lösung und konnte daher nicht wie PERV-rp15E affinitätschromatographisch aus dem Zelllysate isoliert werden. Um das gewünschte Antigen anzureichern, wurden die unlöslichen Rückstände mehrmals mit PBS gewaschen und in 8M Harnstoff in Lösung gebracht. Durch Harnstoff/PBS-Fällung konnte der überwiegende Teil unerwünschter *E.coli*-Proteine entfernt werden. Durch dieses Verfahren konnte CBP-rgp41 bis auf ca. 70% der Gesamtproteinmenge angereichert werden. Die Koreinigung eines ca. 40kDa großen *E.coli*-Proteins mit ähnlichem Löslichkeitsverhalten konnte mit dieser Methode nicht verhindert werden (Abb. III.14).

Parallel zu diesem Versuch wurde ein von der Firma Roche erhaltenes gp41 eingesetzt, das hier im Folgenden als Roche-gp41 bezeichnet wird. Dieses ebenfalls rekombinant hergestellte gp41 ist mit einem ca. 60kDa großen Fusionsprotein versehen, durch das die Löslichkeit in wässriger Umgebung deutlich erhöht wird (Scholz et al., 2005). Wie das CBP-gp41-Konstrukt enthält es die Ektodomäne ohne Fusionspeptid, abgeleitet von HIV-1 (NL 4-3). Eine schematische Darstellung der Konstrukte ist in Abb. III.14 dargestellt.

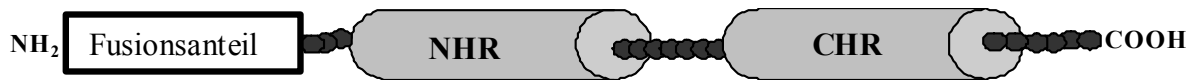


Abb. III.14: Schematischer Aufbau des zur Immunisierung verwendeten rekombinanten gp41.

Zur Immunisierung wurden zwei, vor allem in den Fusionsproteinen unterschiedliche Konstrukte, eingesetzt. In beiden Konstrukten ist das N-terminale Fusionspeptid sowie der C-terminale Transmembrandurchgang und der zytoplasmatische Teil deletiert. Unterschiede waren vor allem in der Löslichkeit zu beobachten. Das Größenverhältnis zwischen der gp41-Ektodomäne und dem Fusionsanteil ist durch diese Darstellung nicht wiedergegeben.

Die Expressionsprodukte wurden durch SDS-PAGE und Western Blot Analyse charakterisiert. In der Western Blot Analyse zeigte mAb2F5 eine starke Bindung an das CBP-rgp41 und eine relativ schwache Bindung an das Roche-gp41 (Abb. III.15).

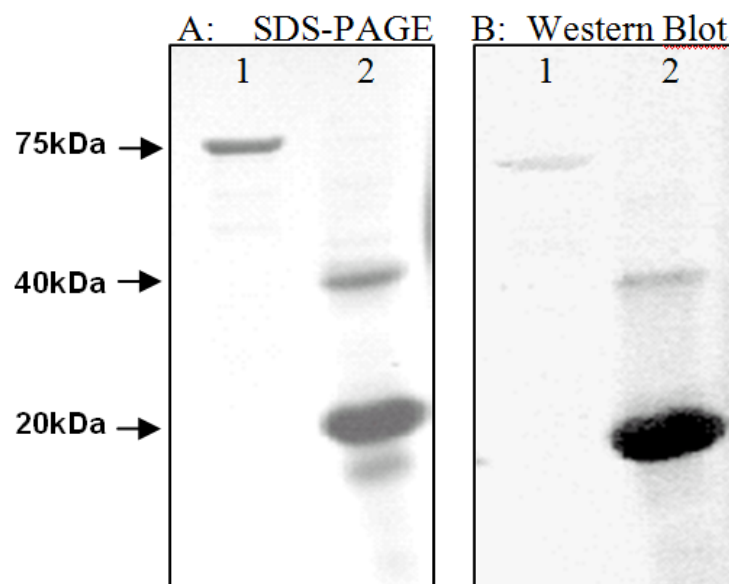


Abb. III.15: Generierung der rekombinanten Ektodomäne von gp41 als CBP-Fusionsprotein. A: SDS-PAGE/Coomassie-färbung.

Auftrag: Spur1: Roche-gp41 (ca.75kDa), Spur2: CBP-gp41. B.: Western Blot Analyse mit mAb2F5 (1:20000). Auftrag wie in der SDS-PAGE.

Vier Wistar-Ratten wurden mit CBP-rgp41, sieben mit dem Roche-gp41 nach dem Standardprotokoll immunisiert. Getestet wurden die Seren 21 Tage nach der zweiten Immunisierung (*Boost*). In allen Seren konnten spezifische Antikörper gegen gp41 detektiert werden (Abb. III.17). Um eine möglichst genaue Titerbestimmung der im Serum enthaltenen gp41-spezifischen Antikörper zu erhalten, wurde die Ausverdünnung der Seren auf dem jeweils anderen Antigen im ELISA durchgeführt. Dadurch sollte eine Abschätzung ermöglicht werden, in welchem Maß Antikörper gegen als Verunreinigung im Immunisierungsmaterial enthaltene *E.coli*-Proteine bzw. die angefügten Fusionsproteine induziert wurden.

Durch die Immunisierung mit CBP-rgp41 konnten in allen Ratten hohe Titer an gp41-spezifischen Antikörpern induziert werden. In allen Seren konnte eine spezifische Bindung an gp41 bis zu einer Verdünnung von $1:10^5$ detektiert werden. Die Unterschiede in Abhängigkeit vom adsorbierten Antigen sind dabei relativ gering, so dass man davon ausgehen kann, dass der überwiegende Teil der induzierten Antikörper gegen gp41 induziert wurde.

Durch die Immunisierung mit dem Roche-gp41 konnten ebenfalls hohe Titer an gp41-spezifischen Antikörpern induziert werden. Die deutlich geringere Bindung der anti-Roche-gp41-Seren an das CBP-gp41 deutet jedoch auch auf die Induktion von Antikörper gegen den Fusionsanteil hin (s.Abb. III.16). Diese Antikörper binden zwar das zur Immunisierung eingesetzte Roche-gp41, jedoch nicht das CBP-gp41 (Abb. III.16B). Der Unterschied in der Bindung an CBP-gp41 zwischen den beiden Gruppen (Abb. III.16A), weist auf geringere Titer an gp41-spezifischen Antikörper in den anti-Roche-gp41-Seren hin.

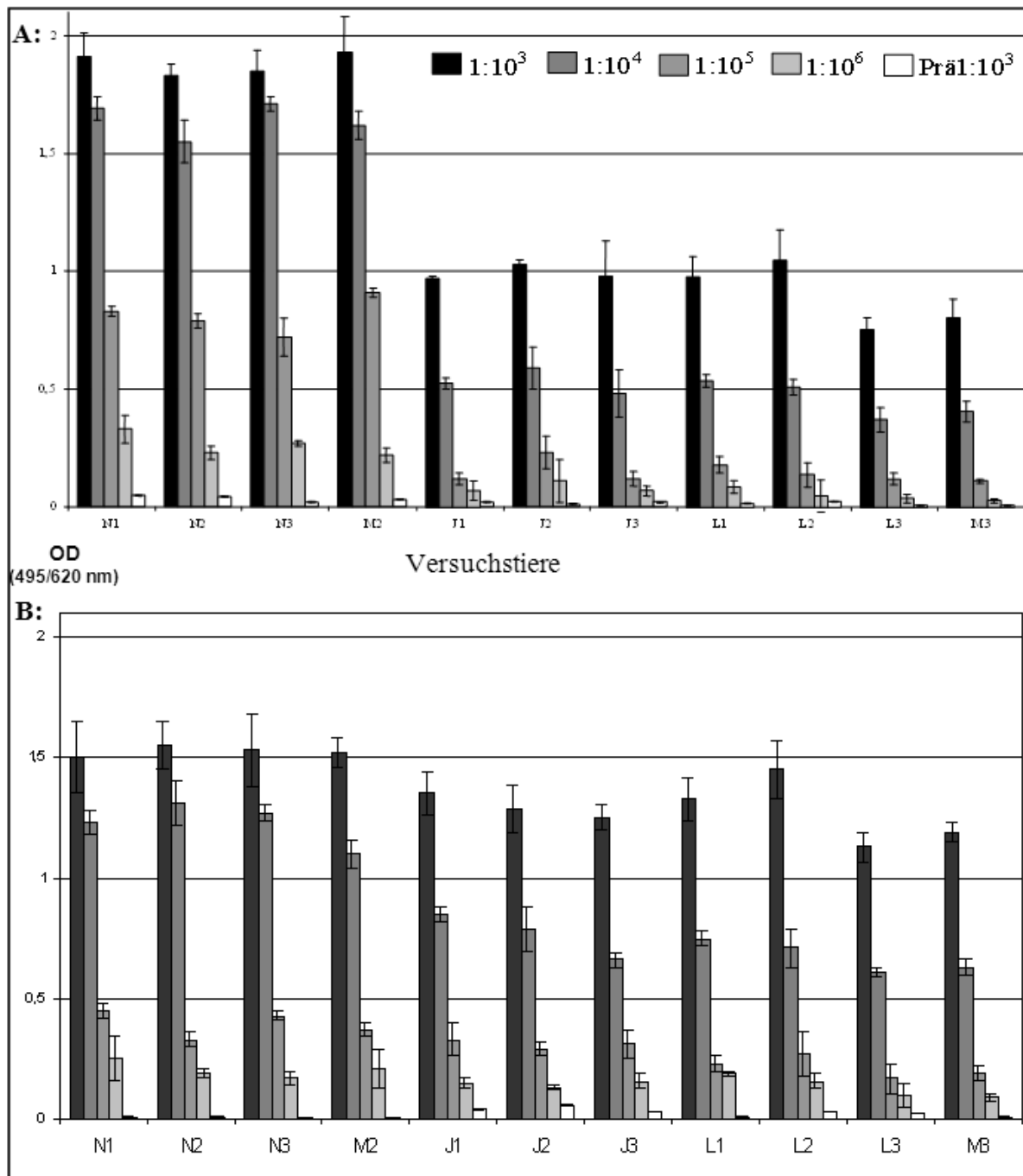


Abb. III.16: Nachweis gp41-bindender Antikörper in den generierten Seren durch ELISA.

Die Immunsereen wurden in den Verdünnungen 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵ und 1:10⁶ eingesetzt. Die Präimmunsereen in einer Verdünnung von 1:10³. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen. **A:** Im ELISA bindende Antikörper gegen das zur Immunisierung der Tiere N1-3 und M2 eingesetzte CBP-gp41. **B:** Im ELISA bindende Antikörper gegen das zur Immunisierung der Tiere J1-3, L1-3 und M3 eingesetzte Roche-gp41. Bis zu einer Verdünnung von 1:10⁵ ist in allen Immunsereen im Vergleich zu den jeweiligen Präimmunsereen eine spezifische Bindung an gp41 detektierbar.

III.3.2 Neutralisationstest und Epitopkartierung

Alle generierten Seren wurden auf HIV-1-neutralisierende Aktivität untersucht. Für den Test wurden die *Boost*-Seren in einer Verdünnung von 1:16 eingesetzt. Als HIV-neutralisierend wurden Seren gewertet, die im Vergleich zum jeweiligen Präimmunserum mindestens 75% ($\Delta ct > 2$) weniger Provirusintegration bewirkten. Für keines der induzierten Seren konnte nach den festgelegten Kriterien eine virushemmende Wirkung nachgewiesen werden.

Für die generierten Seren wurde eine Epitopkartierung durchgeführt. In allen Seren konnten Antikörper gegen den N-terminalen Bereich (E1-Bereich) der Ektodomäne nachgewiesen werden. In Abhängigkeit von dem zur Immunisierung eingesetzten Konstrukt wurde ca. 15 bis 55 Aminosäuren C-terminal vom Cysteinloop gelegen ein zweites Epitop im CHR-Bereich detektiert, wobei die Seren der Tiere J1, L2, L3 und M3 (gegen Roche-gp41 immunisiert) keine Antikörper gegen den CHR-Bereich enthielten. In keinem Serum konnten bindende Antikörper gegen den membranproximalen Bereich der Ektodomäne (E2-Bereich/2F5- oder 4E10-Epitop) nachgewiesen werden.

	AVGIGALFLG	FLGAAGSTMG	CTSMTLTVQA	RQLLSDIVQQ	QNNLLRAIEA	QQHLLQLTVW	GIKQLQARIL
N1:							
N2:							
N3:							
M2:							
J1:							
J2:							
J3:							
L1:							
L2:							
L3:							
M3:							
	AVERYLKDQQ	LLGIWGCSGK	LICTTAVPWN	ASWSNKSLEQ	IWNNMTWMEW	DREINNYTSL	IHSLIEESQN
N1:							
N2:							
N3:							
M2:							
J1:							
J2:							
J3:							
L1:							
L2:							
L3:							
M3:							
	QQEKNEQELL	<u>ELDKWASLWN</u>	<u>WFNITNWLWY</u>	IKLFIMIVGG	LVGLRIVFAV	LSIVNRVRQG	YSPLSFQTHL
N1:							
N2:							
N3:							
M2:							
J1:							
J2:							
J3:							
L1:							
L2:							
L3:							
M3:							

Abb. III.17: Epitopkartierung der generierten HIV-1-gp41 spezifischen Immunseren.

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der gp41-Ektodomäne. Die Tiere N1-3 und M2 wurden mit CBP-gp41, Tiere J1-3, L1-L3 und M3 mit Roche-gp41 immunisiert. Die Erkennungssequenzen der monoklonalen Antikörper 2F5(ELDKWA) und 4E10(NWFNIT) sind unterstrichen.

III.4 Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers 2F5

Die vollständige Aufklärung des Bindungs- und Neutralisationsmechanismus von 2F5 könnte ein wichtiger Beitrag zur Konstruktion von Antigenen sein, die in der Lage sind solche Antikörper zu induzieren.. Die Tatsache, dass durch Immunisierung mit Peptiden, die den Epitopen 2F5 und 4E10 entsprechen, keine neutralisierenden Antikörper induziert werden konnten, legt die Vermutung nahe, dass die Antikörper an Konformationsepitope binden.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Neutralisations- und Bindungsmechanismus von 2F5. Die Erkenntnisse, die bei der Untersuchung des Wirkmechanismus der PERV-neutralisierenden Antikörper gesammelt wurden, wurden in die Versuchsplanung mit einbezogen werden.

III.4.1 Epitopkartierung von mAb 2F5

Für 2F5 wurde eine Bindung an das lineare Epitop ELDKWA im membranproximalen Bereich der Ektodomäne von gp41 beschrieben (Muster et al., 1995). Diese Sequenz konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen durch ELISA und Western Blot Analysen mit überlappenden Peptiden bestätigt werden.

In den durchgeführten Experimenten (Western Blot Analyse und ELISA) konnte die spezifische Bindung von mAb2F5 an ELDKWA-enthaltene Peptide (T20/DP178/NIH-6373) bestätigt werden (Abb. III.18, Abb. III.20). Es wurde jedoch eine deutliche stärkere Bindung des Antikörpers an die rekombinant exprimierte gp41-Ektodomäne beobachtet. Die Präsentation des ELDKWA-Epitopes im Molekül der gp41-Ektodomäne führte, im Vergleich zur Präsentation in abgeleiteten Peptiden, zu einer deutlich gesteigerten Bindung von 2F5 (Abb. III.18).

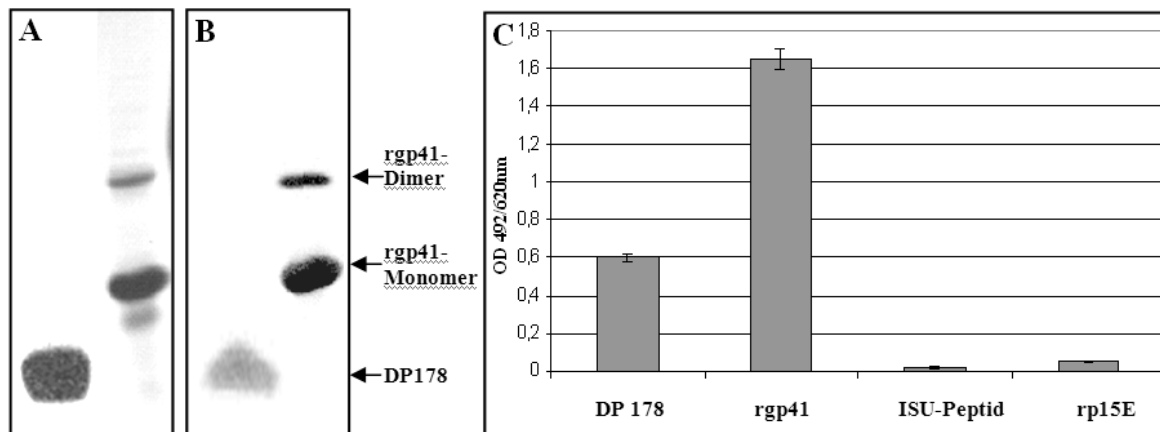


Abb. III.18: Vergleich der Bindung von 2F5 an DP178 und die gp41-Ektodomäne

A: SDS-PAGE, Detektion der aufgetrennten Proteine durch Coomassie-Färbung. Das rekombinante gp41 bildet Dimere; B: Detektion von DP178 und gp41 durch Western Blot Analyse mit 0,5µg mAb 2F5. In beiden Versuchen wurden identische Proteinengen von DP178 (25µg) und rgp41 (10µg) aufgetragen. C: Vergleich der Bindung von 2F5 an T20/DP178 und rgp41 im ELISA. Als Kontrollen wurde das HIV-ISU-Peptid und rp15E von PERV eingesetzt. Der mAb 2F5 bindet im ELISA deutlich besser an das rgp41 als an das ELDKWA-enthaltende T20/DP178. Keine Bindung erfolgte an das im gleichen *E.coli*-Stamm exprimierte rp15E und das HIV-ISU-Peptid. Die Proteine wurden in äquimolaren Mengen aufgetragen. ELISA-Werte wurden als Triplikate gemessen.

Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen, wurde, wie schon bei der Kartierung von Epitopen bei PERV-p15E, eine PepSpot-Membran zur genauen Epitopkartierung verwendet. Durch fraktioniertes Blotting erlaubt diese Methode bedingt auch die Identifizierung von diskontinuierlichen Epitopen. Des Weiteren verfügen die auf der PepSpot-Membran am C-Terminus über einen Acetyl-Linker immobilisierten Peptide über eine höhere Beweglichkeit als die an ELISA-Platten adsorbierten Peptide, was zu einer bessern Ausbildung von schwachen Bindungen führen kann.

Durch diesen Versuch wurde die bereits veröffentlichte Sequenz des 2F5-Epitops bestätigt. Eine Bindung an weitere Sequenzen des gp41 wurde nicht beobachtet (Abb. III.19).

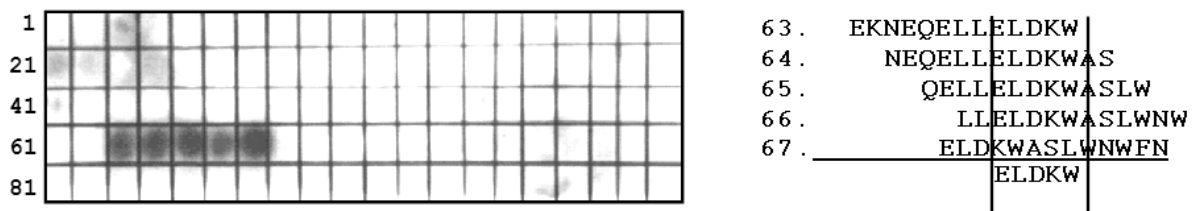


Abb. III.19: Epitopkartierung des monoklonalen Antikörpers 2F5 unter Verwendung einer PepSpot-Membran.

A: Bindung von 2F5 (200ng/ml) an die PepSpots 63-67. Eine Bindung an weitere PepSpots wird nicht detektiert.

B: Sequenz der detektierten PepSpots. Alle Peptide enthalten ELDKW als gemeinsame Sequenz.

III.4.2 Identifizierung von Sequenzen die mit dem 2F5-Epitop interagieren

Die im Kapitel 3.4.1. gezeigten Daten implizieren, dass neben dem bereits identifizierten Epitop (ELDKWA) weitere Sequenzabschnitte innerhalb der gp41-Ektodomäne zur Bindung von 2F5 beitragen. Durch die Epitopkartierung konnte eine solche Sequenz jedoch nicht identifiziert werden. Durch ELISA-Bindungsstudien mit überlappenden Peptiden sollte untersucht werden, ob bindungssteigernde Sequenzen im Env- oder Gag-Protein identifiziert werden können.

Die Untersuchung zum Wirkmechanismus PERV-neutralisierender Antikörper zeigte die mögliche Interaktion zwischen den N- und C-terminal gelegenen Bereichen der Ektodomäne des Transmembranproteins. Diese Interaktion konnte durch *in vitro*-Neutralisationsassays sowie im ELISA dargestellt werden. Durch diese Versuche sollte überprüft werden, ob für den monoklonalen Antikörper 2F5 ein ähnlicher Bindungsmechanismus nachgewiesen werden kann.

Zunächst wurde mit einer Peptidbibliothek eine Epitopkartierung mittels ELISA durchgeführt. Die Peptidbibliothek besteht aus sich um jeweils 11 Aminosäuren überlappenden 15meren Peptiden und umfasst die komplette Sequenz des Env-Komplexes sowie des Gag-Proteins. Die Durchmusterung dieser Peptidbibliothek zeigte erwartungsgemäß ausschließlich eine Bindung an ELDKWA-enhaltende Peptide (Daten nicht gezeigt). Die stärkste Bindung von 2F5 wurde an das Peptid NIH-6373 detektiert. In diesem Peptid liegt die ELDKWA-Sequenz mittig. Mit Verlagerung der Sequenz zum N- bzw. C-terminus der Peptide nimmt die Bindung von 2F5 ab. Dies entspricht den bereits veröffentlichten Daten.

Um mögliche bindungsunterstützende Sequenzen zu identifizieren, wurde das Peptid mit der höchsten Affinität zu 2F5 (Peptid NIH-6373) in Kombination mit jedem weiteren Peptid des Peptidsets eingesetzt. Durch eine ähnliche Versuchsanordnung konnte die synergistisch gesteigerte Bindung von PERV-neutralisierenden Antikörper an die Peptide PERV-E1/E2 nachgewiesen werden. Um eine mögliche Steigerung der Bindungsstärke von mAb2F5 an das ELDKWA-Epitop durch die Kombination mit anderen Peptiden detektieren zu können, wurde der Versuch in Anwesenheit verschiedener Harnstoffkonzentrationen durchgeführt.

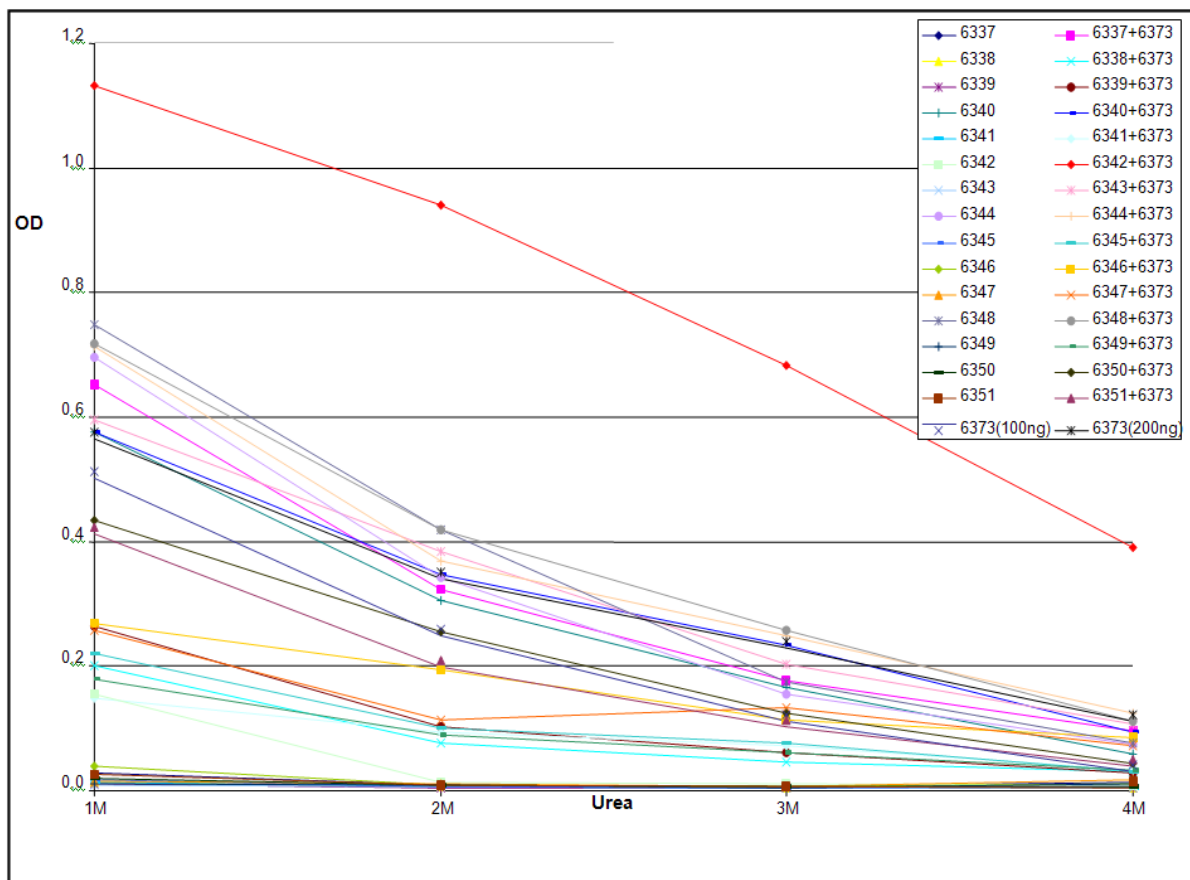


Abb. III.20: Bindung des monoklonalen Antikörpers 2F5 an von der gp41-Ektodomäne abgeleitete Peptide unter verschiedenen Harnstoffkonzentrationen.

Eine Bindung an Einzelpeptide konnte nur an ELDKWA-enhaltene Peptide festgestellt werden. Ausschließlich die Kombination des Peptides 6342 mit dem ELDKWA-enhaltenen Peptid 6373 führt zu einer deutlich gesteigerten Bindung, die auch in Anwesenheit höherer Harnstoffkonzentrationen deutlich über der an die Einzelpeptide liegt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist hier nur eine kleine Auswahl der getesteten Peptide dargestellt (Peptid 6337-6351, abgeleitet vom N-terminalen Bereich der Ektodomäne). Es wurden jeweils 100ng von jedem Peptid adsorbiert. 2F5 wurde in einer Konzentration 0,5µg/ml eingesetzt.

In diesem Experiment wurden insgesamt 334 Peptide auf eine Interaktion mit dem Peptid NIH-6373 untersucht. Es konnte ein Peptid (Peptid NIH-6342) identifiziert werden, das in Kombination mit Peptid NIH-6373 zu einer deutlichen Steigerung der Bindung von 2F5 führt. Die aktive Sequenz konnte nicht weiter eingegrenzt werden, da die benachbarten Peptide keine Auswirkung auf die Bindung von 2F5 zeigten. Eine Bindung von 2F5 an das Einzelpeptid NIH-6342 wurde nicht detektiert. Der Versuch wurde unter verschiedenen Harnstoffkonzentrationen durchgeführt. Mit steigender Harnstoffkonzentration kann die gesteigerte Bindung von 2F5 noch deutlicher dargestellt werden (Tab. III.4, Abb. III.20).

Tab. III.4: Ermittlung der Bindungsstärke von 2F5 an Einzelpeptide und an die Kombination der Peptide mit dem das ELDKWA-Epitop enthaltenden Peptid 6373 im ELISA.

Peptid	Bindungsstärke von 2F5 in [%] in Anwesenheit verschiedener Harnstoffkonzentrationen (einzeln/Kombination mit 6373)			
	1M	2M	3M	4M
6341:STMGAASVTLTVQAR	2,3/101,9	1,7/102,1	1,5/102,2	0,1/83,1
6342: AASVTLTVQARLLLS	2,7/200,2	4,1/276,5	0,3/299,2	0,1/348,2
6343: TLTVQARLLLSGIVQ	1,6/105,4	1,5/112,9	0,02/89,4	0,1/95,5
6373: NEQELLELDKWASLW	100	100	100	100

Der Versuch wurde unter verschiedenen Harnstoffkonzentrationen (1M, 2M, 3M und 4M) durchgeführt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind hier exemplarisch die Daten für drei Peptide gezeigt. In diesem Versuch wurden insgesamt 334 überlappende Peptide (abgeleitet vom GAG bzw. ENV-Proteinen) eingesetzt. Peptid 6342 (Werte rot eingrahmt) führte als einziges Peptid zu einer deutlichen Bindungssteigerung von 2F5 an Peptid 6373.

III.4.3 Einfluss verschiedener stöchiometrischer Verhältnisse der Peptide 6342 und 6373 auf die Bindung von 2F5

Transmembranhüllproteine von Retroviren liegen auf der Virusoberfläche als Trimere vor. Drei NHR-Bereiche lagern sich dabei zentral zusammen, in die dadurch entstehenden äußeren Furchen lagern sich während des Infektionszyklus die drei C-terminalen Helices. Diese multimere Struktur könnte auch für die Präsentation des 2F5-Epitopes von Bedeutung sein.

Um zu untersuchen, ob verschiedene stöchiometrische Verhältnisse der Peptide 6342 zu 6373 Einfluss auf die Bindung von 2F5 haben, wurden im ELISA die Peptide in verschiedenen molaren Verhältnissen miteinander kombiniert.

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis beider Peptide einen deutlichen Einfluss auf die Bindung von 2F5 hat. Ab einem Verhältnis von 2:1 war eine Steigerung der Avidität von 2F5 auf das Doppelte zu beobachten. Der Versuch zeigt, dass die Bindung von 2F5 an die Peptide 6342/6373 ein Optimum erreicht (Abb. III.21). Die weitere Erhöhung des Anteils des Peptides 6342 führte zu keiner weiteren Steigerung der Bindung.

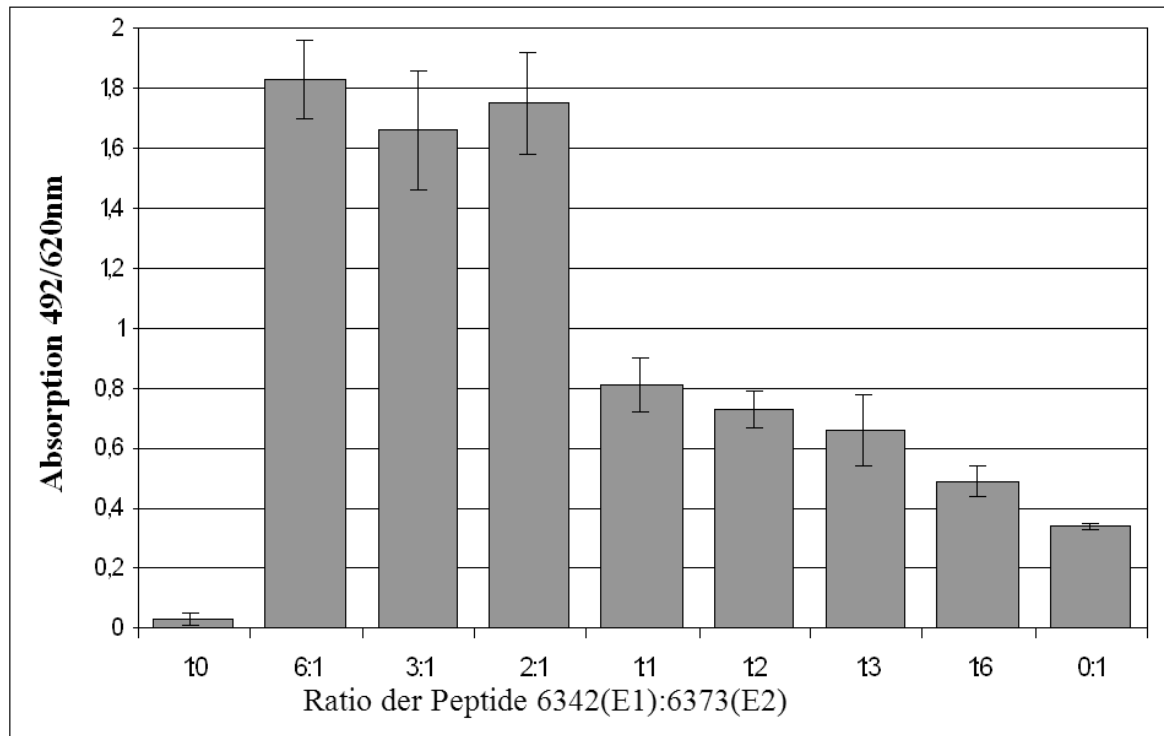


Abb. III.21: Einfluss verschiedener stöchiometrischer Verhältnisse des Peptids P6342 zum Peptid P6373 auf die Bindung von 2F5.

Die Inkubation des mAb2F5 (in allen Ansätzen 0,2µg/ml) wurde in Anwesenheit von 1M Harnstoff durchgeführt. Eingesetzte Peptidmengen der Peptide 6342/6373 [ng/well]: 100/0 (1:0); 600/100 (6:1); 300/100 (3:1); 200/100 (2:1); 100/100 (1:1); 50/100 (1:2); 33,3/100 (1:3); 16,6/100 (1:6).

III.4.4 Einfluss von Aminosäuresubstitutionen im Peptid NIH-6342

Durch Kombination des Peptides 6373 mit dem Peptid 6342 konnte eine deutliche Steigerung der Avidität des Antikörpers 2F5 zur ELDKWA-Sequenz beobachtet werden. Die überlappenden Peptide NIH-6341 und NIH-6343 führten nicht zu diesem Effekt. Um die bindungsunterstützenden Sequenzen genauer eingrenzen zu können, wurden im Peptid 6342 Aminosäuresubstitutionen durchgeführt. Dazu wurden die Peptide 6342mut1-5 synthetisiert und in ELISA-Bindungsstudien eingesetzt. Die Peptide wurden im optimalen stöchiometrischen Verhältnis (2:1, siehe 3.4.3) eingesetzt.

Durch diesen Versuch gelang keine genaue Eingrenzung von aktiv an der Bindung beteiligten Aminosäuren. Jedes der eingesetzten Peptide führte zu einer gesteigerten Bindung von 2F5, keines jedoch so stark wie das Wildtyppeptid (6342wt). Am stärksten wurde die Bindung durch die Aminosäureaustausche in 6342mut2 und 6342mut5 beeinflusst. Diese beiden Austausche sind etwa sieben Aminosäurereste voneinander entfernt, was zwei Drehungen einer α -Helix entspricht. Da dieser Bereich im viralen gp41 als α -Helix vorliegt, kann man jedoch davon ausgehen, dass Threonin, Leucin sowie Arginin aktiv die Bindung von 2F5 an ELDKWA beeinflussen.

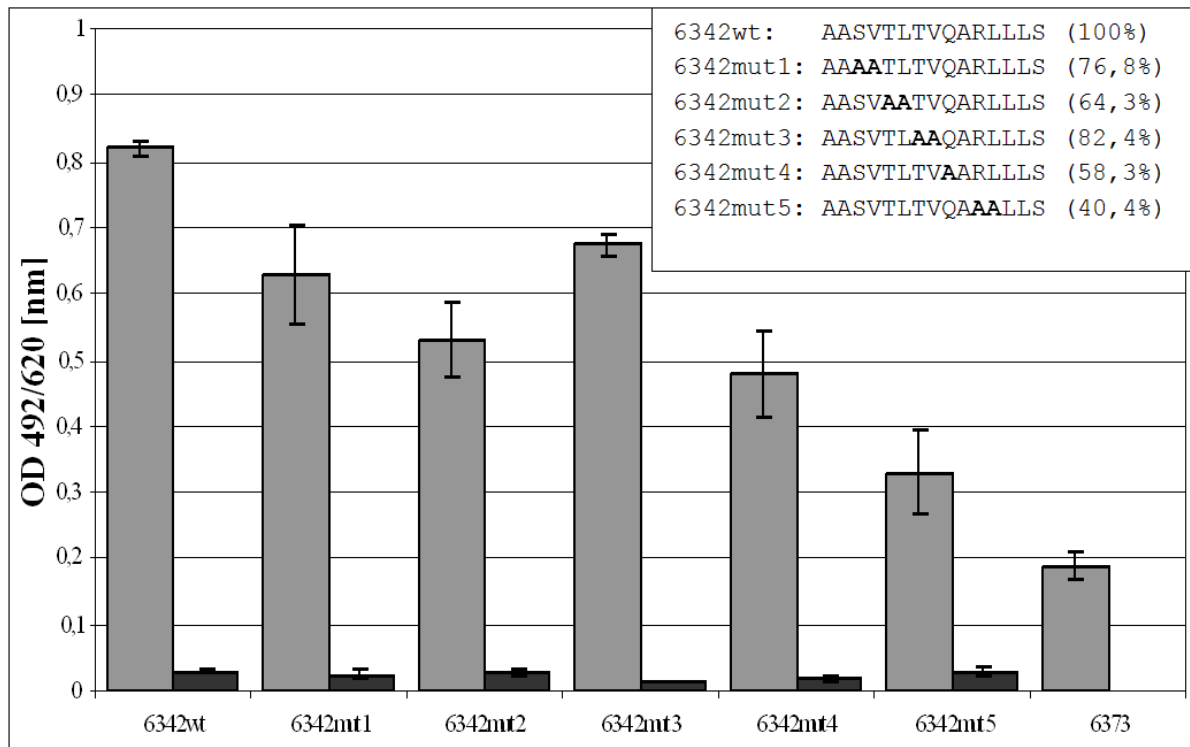


Abb. III.22: Einfluss von Aminosäuresubstitutionen im Peptid NIH-6342 auf die Bindung von 2F5 im ELISA.

Alle von 6342 abgeleiteten mutierten Peptide steigern die Bindung von 2F5 an das ELDKWA-Epitop, jedoch keines so stark wie das Wildtyppeptid. Die Inkubation von 2F5 (0,2µg/ml) erfolgte in Anwesenheit von 1M Harnstoff. Das Verhältnis der Peptide 6342 wt/mut zu 6373 betrug 2:1 (200ng:100ng). Die Sequenz der Peptide 6342 wt/mut 1-5 ist in der Legende dargestellt. Die Alaninsubstitutionen sind mit fett gedruckten Buchstaben gekennzeichnet.

III.4.5 Hemmung der neutralisierenden Aktivität von 2F5 durch synthetische Peptide

Durch die von den innerhalb PERV-p15E identifizierten Epitopen abgeleiteten Peptide konnte die neutralisierende Aktivität der Seren deutlich gehemmt werden (Abb. III.9). In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Kombination beider Peptide eine deutlich effektivere Hemmung zur Folge hatte. Dieser Effekt wurde auf die Bildung eines Konformationsepitops zurückgeführt. Durch Kombination beider Peptide konnte die Bindung des neutralisierenden Antikörpers an sein Antigen deutlich verstärkt werden, was eine stärkere Hemmung zur Folge hat.

Sollte der Wirkmechanismus der PERV-neutralisierenden Antikörper ähnlich dem Wirkmechanismus von 2F5 sein, wäre eine gesteigerte Hemmung von 2F5 zu erwarten. Die Daten der ELISA-Bindungsstudien (Kapitel 3.4.2-4.) deuten auf eine gesteigerte Affinität von 2F5 an die ELDKWA-Sequenz durch die Zugabe des Peptides 6342 hin. Da die Bindungsstärke eines Antikörpers an sein Epitop maßgeblichen Einfluss auf sein neutralisierendes Potential hat, könnte die Zugabe des Peptides 6342 eine gesteigerte Hemmung der Neutralisation durch 2F5 zur Folge haben. Im *in vitro*-Neutralisationsassay sollte untersucht werden, ob durch die Kombination beider Peptide die neutralisierende Aktivität von 2F5 stärker gehemmt werden kann als durch die Einzelpeptide.

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass Peptid 6342 alleine nicht die neutralisierende Aktivität von 2F5 beeinflusst. Durch die Kombination der Peptide 6373 und 6342 verschiebt sich der *ct*-Wert um etwa zwei Einheiten, was einer zusätzlichen Hemmung von 2F5 um ca. 75% entspricht. Die Kombination von 6373 mit einem Kontrollpeptid sowie das Kontrollpeptid alleine, hat keinen Einfluss auf die Wirkung von 2F5.

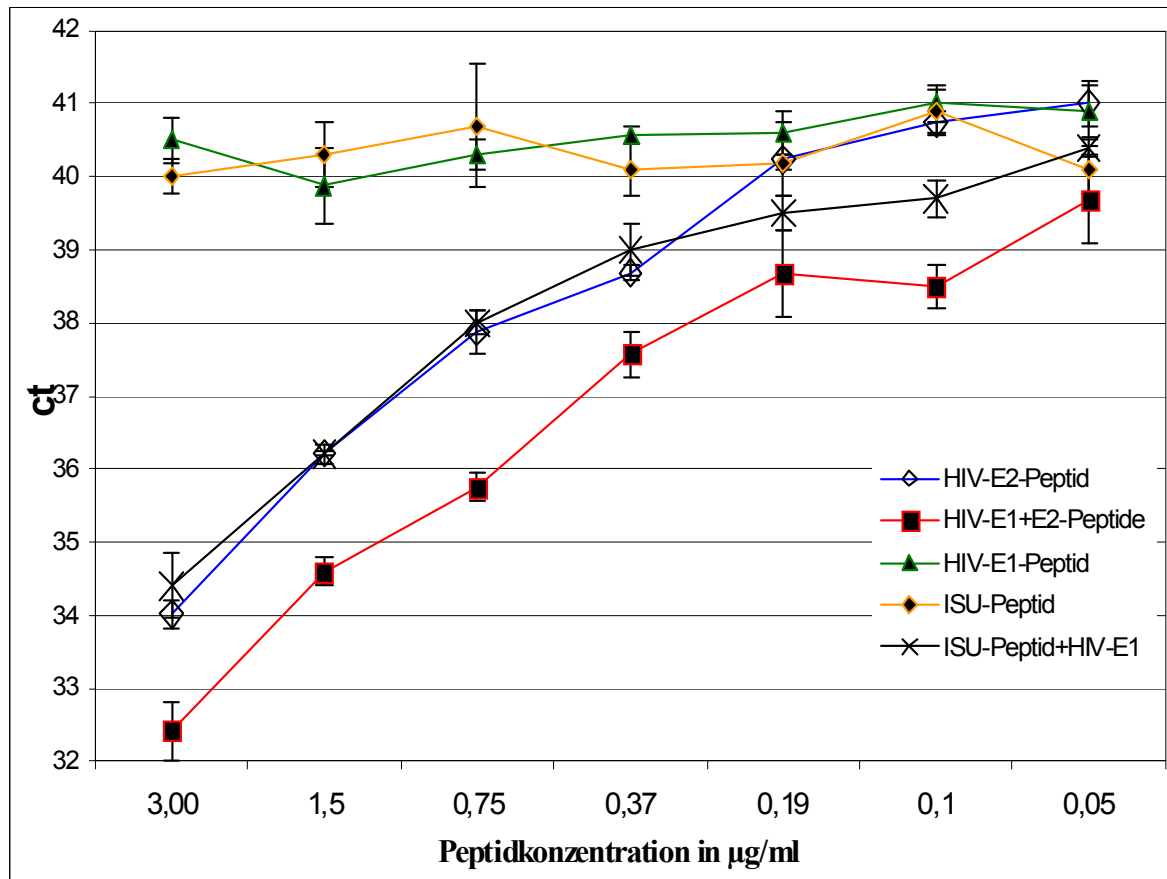


Abb. III.23: Gesteigerte HIV-Provirusintegration durch Hemmung von 2F5.

In Abhängigkeit von der Konzentration des Peptides 6373 wird die Neutralisation durch 2F5 gehemmt. Die Kombination des Peptides 6373 mit dem HIV-ISU-Peptid, sowie das HIV-ISU-Peptid und das Peptid 6342 als Einzelpeptide hatte keinen Einfluss auf die Wirkung von 2F5. Die HIV-neutralisierende Wirkung konnte durch Kombination des Peptides 6373 mit dem Peptid 6342 stärker gehemmt werden. Die Konzentration von 2F5 wurde mit 5µg/ml konstant gehalten.

III.5 Induktion HIV-E1/E2-spezifischer Antikörper

In ELISA-Bindungsstudien und im *vitro*-Neutralisationsassay konnte eine gesteigerte Bindung von 2F5 an die Kombination der Peptide NIH-6342) und NIH6373 gezeigt werden. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Sequenz des N-terminalen Bereiches der gp41 Ektodomäne die Bindung von 2F5 an das ELDKWA-Epitop unterstützte. Zahlreiche, in der Literatur beschriebene Versuche zeigen, dass durch ELDKWA-enthaltende Peptide lediglich bindende, jedoch keine neutralisierenden Antikörper induziert werden konnten.

III.5.1 Immunisierung mit gekoppelten und freien Peptiden

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob unter Verwendung der Kombination beider Sequenzen neutralisierende Antikörper induziert werden können. Für diese Versuche wurden synthetische 25mere verwendet, die von den identifizierten Bereichen abgeleitet wurden und im Folgenden HIV-E1 (enthält die Sequenz des NIH-6342) und HIV-E2 (enthält die Sequenz des NIH-6373) genannt werden. Die Sequenz dieser Peptide ist in Kapitel 2.3 aufgeführt. Es wurden freie und an Dextran gekoppelte Peptide zur Immunisierung von Wistar-Ratten eingesetzt.

Die Kopplung an Dextran (MW: 6kDa, im Folgenden Dextran6 oder Dex6 genannt) erfolgte ungerichtet über die Verknüpfung freier Aminogruppen mit den aktivierten Carbonylgruppen des Dextrans oder gerichtet über den bifunktionalen PDPH-Spacer (Pierce, Rockford, USA). Ausgehend von den Versuchen zum optimalen stöchiometrischen Verhältnis der Peptide NIH-6342/-6373 (Kapitel 3.4.3), wurde für die Immunisierung mit freien Peptiden sowie für die Kopplungen ein molares Verhältnis von 2:1 gewählt. Ungekoppelte Peptide wurden nicht aus dem Reaktionsansatz entfernt, um die Bildung von Komplexen mit gekoppelten Peptiden zu ermöglichen. Die Kopplungseffizienz wurde durch Gelelektrophorese und Western Blot Analyse überprüft (Abb. III.24).

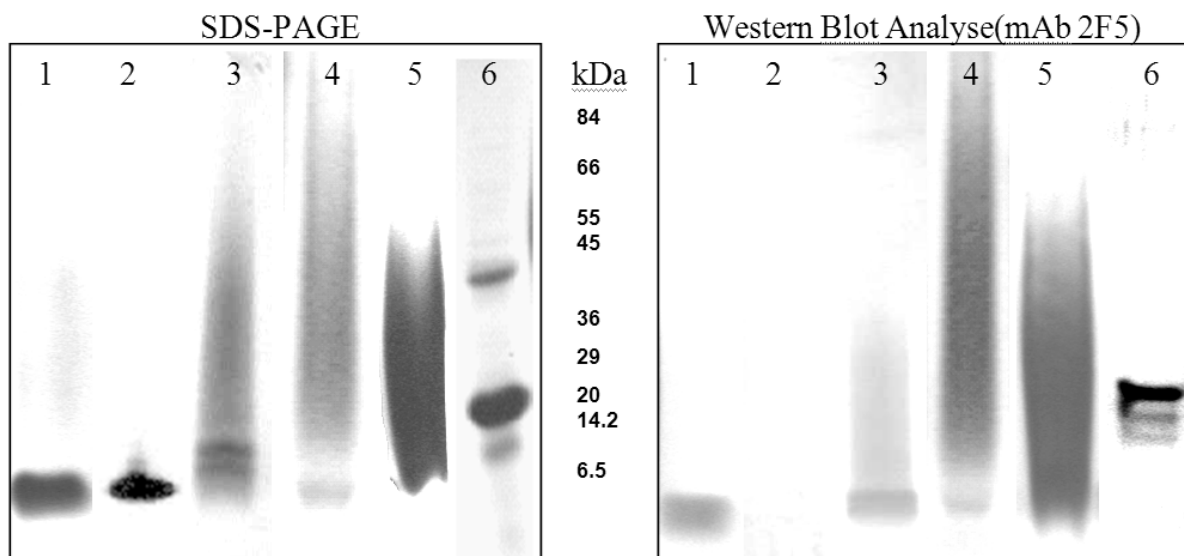


Abb. III.24: Charakterisierung der generierten HIV-E1/E2-Konjugate mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse.

(1) Peptid HIV-E2; (2) Peptid HIV-E1; (3) Peptid HIV-E2 an Dextran6 gekoppelt; (4) Peptide HIV E1/E2 an Dextran6 gekoppelt; (5) Peptide HIV E1/E2 über PDPH-Spacer an Dextran6 gekoppelt; (6) rekombiante Ektodomäne des HIV-1-gp41 (CBP-rgp41). In beiden Versuchen wurden äquivalente Proteinmengen aufgetragen. Die Detektion erfolgte durch Coomassiefärbung bzw. durch DAB-Färbung.

Die Charakterisierung der Kopplungsprodukte zeigte für alle Peptid-Dextran-Konjugate ein sehr heterogenes Gemisch mit einem Molekulargewicht von 6-45 kDa (HIV-E2/Dex6 und HIV-E1/E2-PDPH-Spacer an Dextran6) bzw. 6-70 kDa (Peptide HIV E1/E2 an Dextran6). Durch die Western Blot Analyse konnten noch geringe Mengen höhermolekularer Produkte detektiert werden. Alle Konstrukte wurden mittels 2F5 detektiert. Über das Verhältnis der gekoppelten Peptide kann durch diesen Versuch keine Aussage getroffen werden. Das Peptid HIV-E2 und das Konjugat HIV-E2/Dex6 wurden relativ schwach erkannt. Konjugate, die aus beiden Peptiden erzeugt wurden, wurden besser, jedoch nicht so stark wie das CBP-rgp41 detektiert.

Mit diesen Konstrukten wurden jeweils drei Wistar-Ratten immunisiert. Die Immunisierung erfolgte nach Standardprotokoll. Getestet wurde das Serum der Abnahme drei Wochen nach der Boost-Immunisierung.

Alle Tiere bildeten Antikörper gegen die zur Immunisierung eingesetzten Antigene (Abb. III.25). Keines der Seren zeigte, wie der monoklonale Antikörper 2F5, eine gesteigerte Bindung an die Kombination beider Peptide. Der ELISA zeigte, dass auch gegen die linearen Einzelpeptide Antikörper gebildet wurden. Möglicherweise verhindert die Überlagerung der Effekte verschiedener Antikörperpopulation die Darstellung einer solchen gesteigerten Bindung

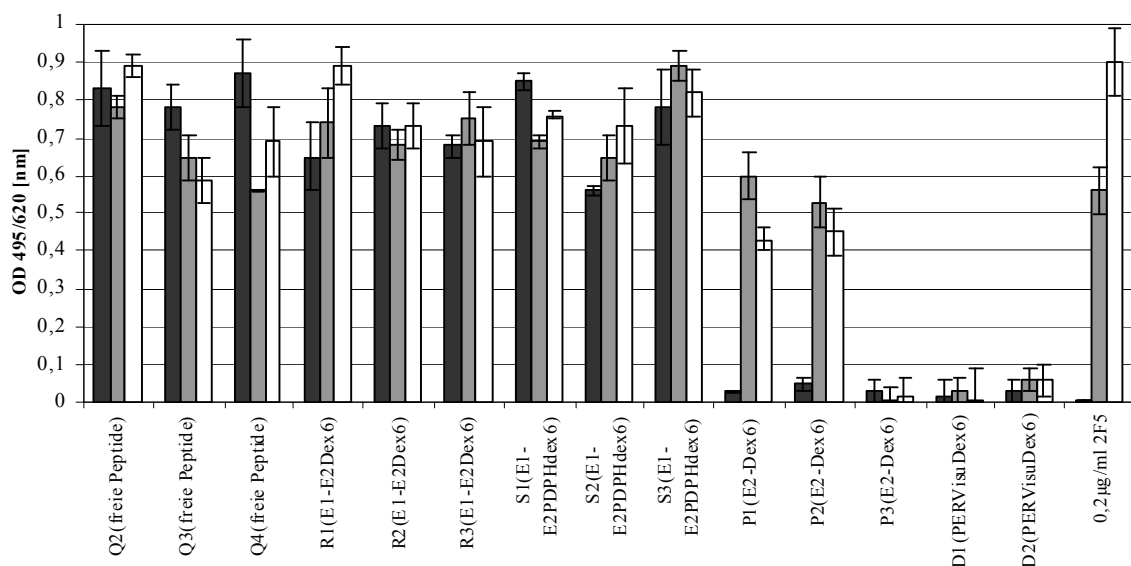


Abb. III.25: Nachweis bindender Antikörper gegen die synthetischen Peptide HIV-E1/E2.

Die Tiere Q2-4 wurde mit freien Peptiden, die Tiere R1-3 mit E1/E2-Dextran-Konjugaten und die Tiere S1-3 mit E1/E2-PDPH-Spacer-Dextran-Konjugaten immunisiert. Als Kontrolle wurden drei Tiere mit E2-Dextran-Konjugaten (P1-3) und zwei mit PERV-ISU-Dextran-Konjugaten immunisiert. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:250 eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden 0,2µg 2F5 eingesetzt.

Die getesteten Immunseren zeigten eine Hemmung der Provirusintegration von 0-99,5%. Den festgelegten Schwellenwert von $\Delta\text{ct} < 2$ überschritten die Seren der Tiere Q3 (immunisiert mit den freien Peptiden HIV-E1 und E2) und S3 (immunisiert mit den Peptiden HIV-E1 und E2 über PDPH-Spacer an Dextran gekoppelt). Für diese Seren konnte bei einer eingesetzten TCID50 eine Hemmung der Provirusintegration gegenüber der jeweiligen Präimmunseren von 99,53 bzw. 95,46% gemessen werden. Die Seren der Tiere, die nur gegen HIV-E2 bzw. mit PERV-ISU-Dextran immunisiert wurden, zeigten erwartungsgemäß keine HIV-neutralisierende Aktivität.

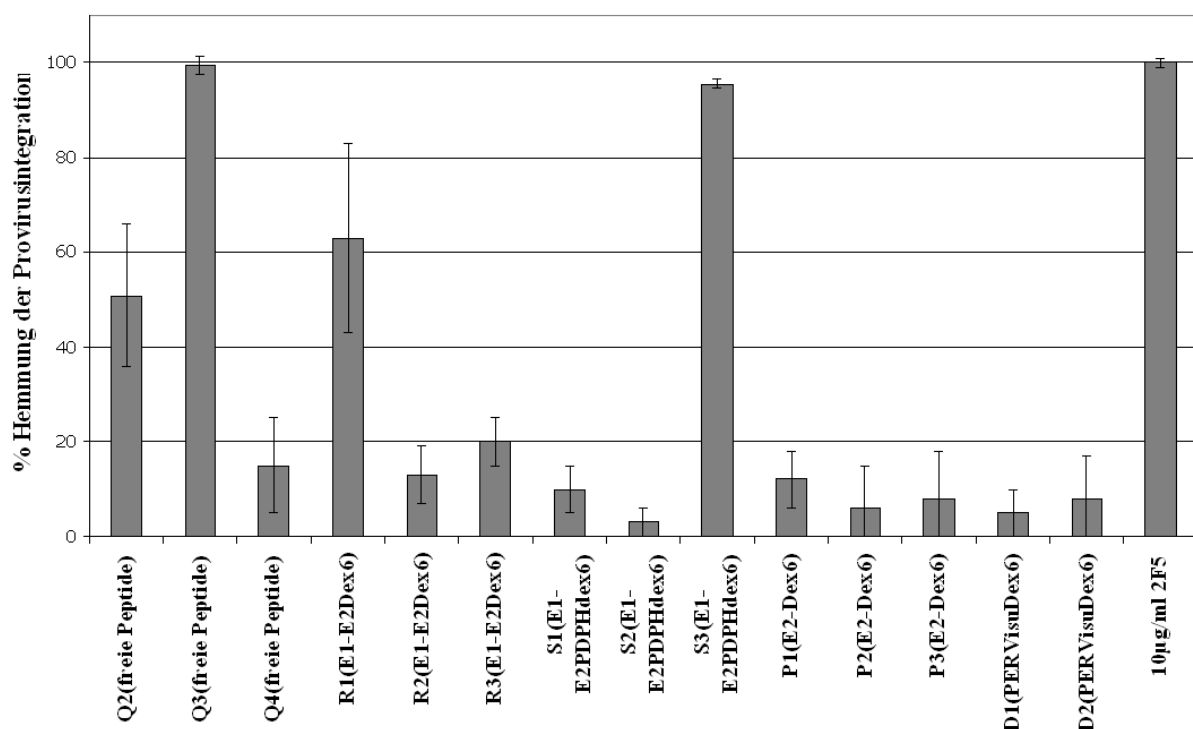


Abb. III.26: Test der Boost-Seren nach Immunisierung im *in vitro*-Neutralisationsassay.

Es wurden jeweils drei Wistar-Ratten mit einem Gemisch der freien Peptide HIV-E1/2 (Tiere Q2-4), mit an aktiviertes Dextran gekoppelte Peptide HIV-E1/2 (Tiere R1-R3), mit über den bifunktionalen Spacer PDPH an Dextran gekoppelte Peptide HIV-E1/2 (Tiere S1-3), mit an aktiviertes Dextran gekoppeltes Peptid HIV-E2 (Tiere P1-3) und mit an aktiviertes Dextran gekoppeltes PERV-ISU-Peptid (Tiere D1-2) immunisiert. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:16 eingesetzt. Als Standard wurde der HIV-neutralisierende monoklonale Antikörper 2F5 in einer Konzentration von 10µg/ml eingesetzt. Die Infektion von 5×10^4 C8166-Zellen erfolgte mit einer TCID50 des HIV-1 IIIB. Alle Werte wurden aus vier Einzelwerten berechnet.

III.5.2 Nachweis der Spezifität der HIV-neutralisierenden Seren

Um sicher zu stellen, dass die gemessene HIV-neutralisierende Wirkung auf einen HIV-spezifischen Effekt durch induzierte IgGs zurückzuführen ist, wurden verschiedene Versuche durchgeführt.

- Test der Anti-HIV-Seren Q3 und S3 im *in vitro* PERV-Neutralisationsassay

Durch diesen Versuch sollte sichergestellt werden, dass in den Immunseren keine unspezifischen Faktoren mit unspezifischer antiviraler Wirkung, wie zum Beispiel Komplement, Zytokine oder Chemokine enthalten sind. Als Kontrolle wurde ein PERV-neutralisierendes Serum eingesetzt (Ratte B1, Abb. III.12). Eine Hemmung der PERV-Replikation durch die Immunseren Q3 und S3 konnte nicht beobachtet werden. Das PERV-spezifische Kontrollserum der Ratte B1 zeigte keine Wirkung auf die Replikation von HIV-1 IIIB (Abb. III.27).

- Hemmung der HIV-neutralisierenden Aktivität durch die synthetischen Peptide HIV-E1/E2

Ist die detektierte neutralisierende Aktivität der Immunseren Q3 und S3 auf die Induktion spezifischer Antikörper gegen die Peptide HIV-E1/E2 zurückzuführen, sollte sich die hemmende Wirkung der Seren durch Zugabe der Peptide HIV-E1/E2 im *in vitro* Neutralisationsassay wieder aufheben lassen. Dafür wurden die Peptide in einer Konzentration von je 2 µg/ml zugesetzt. Beide Seren konnten durch die Peptide HIV-E1/E2 gehemmt werden. Die HIV-hemmende Wirkung ging durch Zugabe von 2 µg/ml Peptid auf ca. 30% zurück, während das Kontrollpeptid keine Auswirkungen auf die HIV-Replikation zeigte. Auf die PERV-Replikation hat die Zugabe der Peptide keinen Einfluss (Abb. III.28).

- Virusneutralisation durch isolierte IgGs

In einem weiteren Versuch zum Ausschluss einer antikörperunabhängigen Virusinhibition wurden IgG's aus dem Serum der Ratte S3 und Q3 sowie dem PERV-p15E-spezifischem Serum der Ratte B1 durch ProteinG-Affinitätschromatographie isoliert.

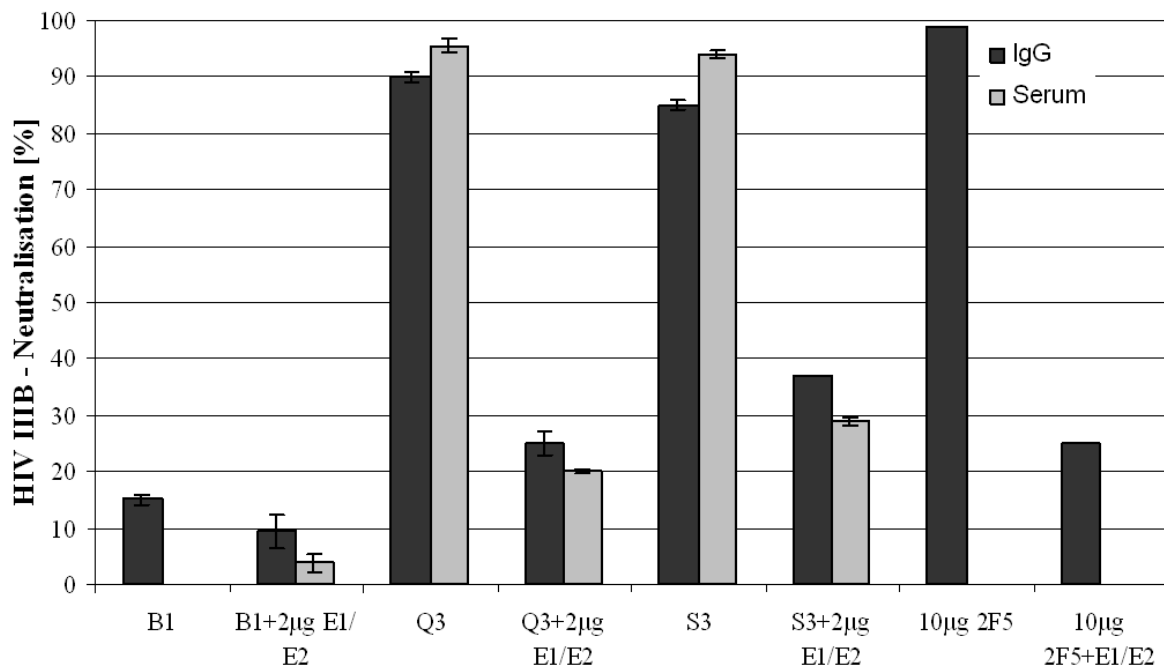


Abb. III.27: HIV-Neutralisation durch Immunseren und isolierte Immunglobuline G.

Die E1/E2-spezifischen Seren der Tiere S3 und Q3 sowie die aus diesen Seren isolierten Immunglobuline der Klasse G (100µg/ml) hemmen die HIV-Replikation. Dieser Effekt konnte durch Zugabe der Peptide E1/2 teilweise wieder aufgehoben werden. Das PERV-p15E spezifische Serum sowie die aus dem Serum isolierten IgG's der Ratte B1 hatten keinen signifikanten Einfluss auf die HIV-Replikation. Alle Seren wurden in einer Verdünnung von 1:16 eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden 10µg/ml 2F5 mitgeführt. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen.

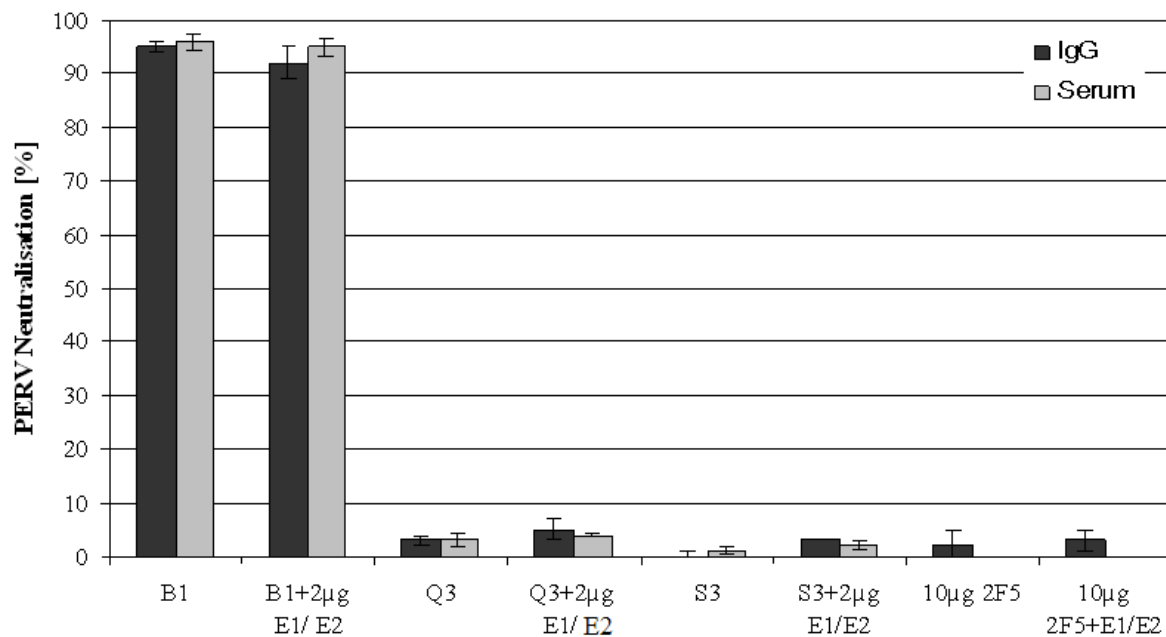


Abb. III.28: PERV-Neutralisation durch Immunsereen und isolierte Immunglobuline G.

Die E1/E2-spezifischen Seren der Tiere S3 und Q3 sowie die aus diesen Seren isolierten Immunglobuline der Klasse G (50µg/ml) haben keinen Einfluss auf die PERV-Replikation. Das PERV-p15E spezifische Serum sowie die aus dem Serum isolierten IgGs der Ratte B1 hemmen die PERV-Replikation. Die Zugabe der Peptide HIV-E1/E2 hat keinen Einfluss auf die PERV-Replikation. Alle Seren wurden in einer Verdünnung von 1:16 eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden 10µg/ml 2F5 mitgeführt. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen.

Aus 2ml Serum konnten insgesamt 0,7mg Immunglobulin G isoliert werden. Die Elutionsfraktionen wurden gegen PBS dialysiert und in einer Konzentration von 100µg/ml im PERV bzw. im HIV *in vitro* Neutralisationsassay eingesetzt.

Zur Kontrolle wurde parallel das gleichbehandelte PERV-neutralisierende Serum der Ratte B1 verwendet. Der Versuch zeigt, dass die HIV-Neutralisation durch das Rattenserum S3 und Q3 auf Immunglobuline der Klasse G zurückgeführt werden kann. Die Hemmung der Provirusintegration durch isolierte IgGs ist mit der Hemmung durch das Immunsereum vergleichbar. Das Serum der Ratte B1 sowie die daraus isolierten IgGs zeigten keinen Einfluss auf die HIV-Replikation (Abb. III.27).

In einem parallel durchgeführten PERV-Infektionsversuch konnte gezeigt werden, dass der beobachtete Effekt HIV-spezifisch ist. Weder die Immunsereen noch die daraus isolierten IgGs zeigten einen Einfluss auf die PERV-Replikation (Abb. III.28).

Die Versuche zeigten, dass durch die Immunisierung mit synthetischen Peptiden HIV-E1/E2 neutralisierende Antikörper induziert werden konnten. Eine Induktion virushemmender Faktoren, wie Zytokine oder Chemokine, wird ausgeschlossen. Die Bestätigung der Daten durch ein unabhängiges Labor mit alternativen Methoden konnte für die Seren der Tiere S3 und Q3 leider nicht durchgeführt werden, da für diese Versuche in der Lebenszeit der Tiere nicht ausreichend Immunserum gesammelt werden konnte.

III.5.3 Reproduktion der Ergebnisse und statistische Absicherung

Zur Reproduktion der Daten wurde die Immunisierung durch die freien Peptide HIV-E1/E2 nach gleichem Protokoll in einer größeren Gruppe (10 Wistar-Ratten) durchgeführt. Um die Daten in einem unabhängigen Labor durch einen alternativen Neutralisationsassay bestätigen zu lassen, wurde die Immunseren parallel im Labor von Dr. S. Norley mittels p24-Capture-ELISA getestet.

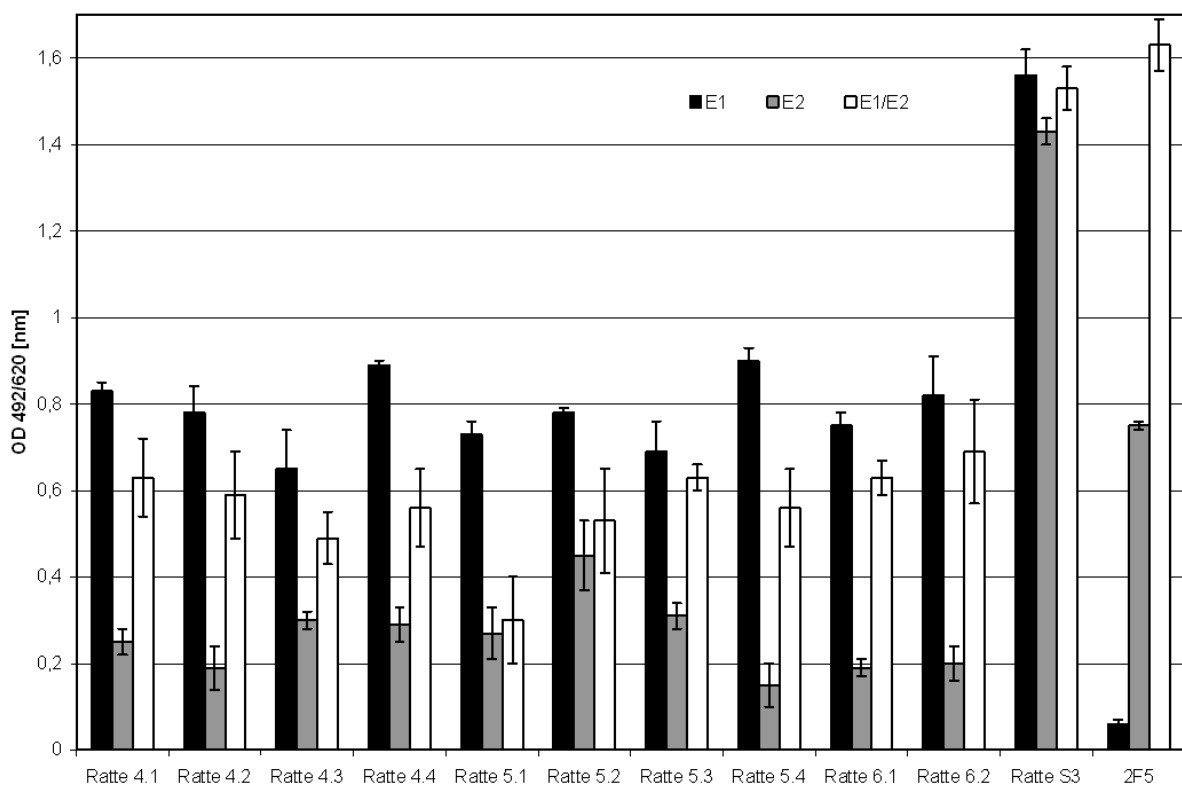


Abb. III.29: Bindung der induzierten Antikörper an die Peptide HIV-E1/E2.

Es wurden 25ng/well Peptid adsorbiert. Zum Vergleich wurde das neutralisierende Rattenserum S3 sowie 0,2µg/ml 2F5 mitgeführt. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen.

Wie im ersten Versuch konnte in allen Seren bindende Antikörper gegen die zur Immunisierung eingesetzten Peptide nachgewiesen werden. Allgemein wurde ein deutlich geringerer Titer an bindenden Antikörpern in den Immunseren detektiert. Auffällig ist die Dominanz E1-spezifischer Antikörper, währenddessen gegen das E2-Epitop nur geringe Mengen an Antikörpern gebildet wurden.

Die Boost-Seren wurden unabhängig mittels *Realtime*-PCR und p24-*Capture*-ELISA auf Hemmung der HIV-Neutralisation getestet. In keinem der Seren konnte HIV-neutralisierende Aktivität nachgewiesen werden.

III.6 Zusammenfassung: Induktion bindender und neutralisierender Antikörper gegen PERV und HIV

In den durchgeführten Versuchen konnten viele Gemeinsamkeiten zwischen PERV-neutralisierenden Antikörpern und dem HIV-neutralisierenden Antikörper 2F5 nachgewiesen werden.

Tab. III.5: Gegenüberstellung der experimentellen Daten der Untersuchungen zu PERV- bzw. HIV-neutralisierender Antikörper:

PERV	HIV
Epitopmapping:	
Identifizierung von zwei Antikörperbindungsstellen, jeweils eine im N- und C-terminalen Bereich der Ektodomäne.	Für den monoklonalen Antikörper 2F5 konnte mit dieser Methode nur das bereits veröffentlichte Epitop identifiziert werden.
ELISA-Bindungsstudien:	
Synergistisch gesteigerte Bindung der induzierten Antikörper an die von den Epitopen abgeleiteten Peptide PERV-E1 und -E2.	Identifizierung einer bindungsunterstützenden Sequenz im N-terminalen Bereich, die die Bindung von 2F5 an das ELDKWA-Epitop deutlich steigert. Es wird keine Bindung von 2F5 an das Einzelpeptid (HIV-E1) detektiert.
<i>in vitro</i> Neutralisationsversuch:	
Hemmung neutralisierender Antikörper durch die Kombination der Peptide PERV-E1/E2. Durch die Einzelpeptide können die neutralisierenden Antikörper nicht bzw. nur minimal blockiert werden.	Hemmung der neutralisierenden Wirkung von 2F5 durch ELDKWA-enthaltende Peptide (HIV-E2), die durch Zugabe des HIV-E1-Peptides noch deutlich gesteigert werden kann. Das HIV-E1-Peptid alleine kann die Wirkung von 2F5 nicht inhibieren.
Vorinkubation:	
Die Vorinkubation von Virusüberständen mit neutralisierenden Antikörpern hat keinen Einfluss auf die Provirusintegration.	Die Vorinkubation von Virusüberständen (HIV-1 IIIB) mit 2F5 führt zu einer gesteigerten Neutralisation.

PERV	HIV
Induktion neutralisierender AK durch die rekombinante Ektodomäne des TM-Proteins: Durch die rekombinant generierte Ektodomäne des Es wurde mit verschiedenen rekombinanten Hüllproteins konnte in 100% der Versuchstiere Kondstrukten der gp41-Ektodomäne immunisiert. neutralisierende Antikörper induziert werden.	
Induktion neutralisierender AK durch die von den E1- und E2-Bereichen abgeleiteten Peptide: Durch die von den identifizierten Epitopen abgeleiteten In zwei von 19 Versuchstieren konnten durch Peptide PERV-E1/E2 konnten keine neutralisierenden Immunisierung mit den Peptiden HIV-E1/E2 Antikörper induziert werden. PERV-E1 oder PERV-E2- neutralisierende Antikörper induziert werden. bindende Antikörper sind nicht neutralisierend. ELDKWA-bindende Antikörper, die durch Immunisierung mit dem Einzelpeptid HIV-E2 induziert wurden, sind nicht neutralisierend.	

Zusammengefasst sind die Daten der in dieser Arbeit durchgeführten Neutralisationsassays und der Bindungsstudien. Die Daten basieren auf der Untersuchung des Ziegenserums 20 (PERV) und des monoklonalen Antikörpers 2F5 (HIV) sowie der Seren, die durch Immunisierung mit rekombinanten Proteinen oder synthetischen Peptiden gewonnen wurden.

IV Diskussion

IV.1 Induktion einer protektiven Immunantwort

Die nach der Infektion durch einen pathogenen Erreger im Organismus ablaufenden Abwehrmechanismen basieren, neben der unspezifischen Abwehr durch das Komplementsystem und der angeborenen Immunität, auf der Aktivierung des humoralen und zellulären Immunsystems. Die Induktion neutralisierender Antikörper und zytotoxischer T-Lymphozyten (CTLs) führt im günstigen Fall zur raschen Klärung der Infektion und zu einem dauerhaften Schutz des Organismus vor einer erneuten Infektion durch den gleichen Erreger. Ziel der Impfstoffforschung ist die Entwicklung von Vakzinen und Impfstrategien, die einen solchen Effekt im gesunden Organismus induzieren und so den Impfling präventiv vor einer Infektion schützen.

Nicht jede Infektion kann durch eine schnelle und effektive Immunantwort geklärt werden. Zum Beispiel kann das humane Immundefizienzvirus durch das Immunsystem nicht aus dem Organismus eliminiert werden und führt in den meisten Fällen zum Ausbruch von AIDS und damit zum Tod des Wirtes. Eine Klärung des Virus aus einem infizierten Organismus durch das körpereigene Immunsystem oder durch antivirale Therapien ist bislang noch nicht beobachtet worden. Ob eine Klärung des Virus durch die Induktion neutralisierender Antikörper und/oder CTLs möglich sein wird, ist derzeit völlig unklar. Die in den letzten Jahren deutlich verbesserte antiretrovirale Therapie (HAART) führt trotz vorübergehender Absenkung der Viruslast unter die Nachweisgrenze (ca. 20 RNA-Kopien/ml Blut) nicht zur Klärung des Virus aus dem Organismus. Auch klinische Studien zum passiven Immuntransfer zeigen, dass durch Applikation neutralisierender Antikörper (2F5/2G12) eine Senkung der Viruslast im peripheren Blut bis unter die Nachweisgrenze erreicht werden kann. In beiden Fällen kommt es jedoch nach länger anhaltender Therapie zum Therapieversagen durch die Bildung von Fluchtmutanten. Trotzdem zeigen die Studien zur passiven Immunisierung, dass durch neutralisierende Antikörper das Virus in seiner Replikation erheblich beeinträchtigt wird und freie Viren effektiv an der Infektion neuer Zellen gehindert werden können. Die Induktion solcher neutralisierender Antikörper durch einen präventiven Impfstoff könnte somit mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ausbreitung von HIV nach dem Eindringen in den Organismus verhindern und so zu einer sterilen Immunität führen.

Ziel der Forschungen muss deshalb die Entwicklung eines präventiven Impfstoffes sein, der das Eindringen des Virus in die Zielzellen und dessen Ausbreitung im Wirtsorganismus verhindert. Die allgemeinen Anforderungen an einen effektiven Impfstoff sind im Folgenden

aufgeführt (Janeway et al., 2002), wobei nicht jeder derzeit in breiter klinischer Anwendung befindliche Impfstoff alle diese Anforderungen erfüllt.

- Induktion eines nahezu 100%iger Schutzes der Impflinge vor der Infektion durch möglichst alle Varianten des Erregers.
- Die Impfung sollte mehrjährigen, im Idealfall lebenslangen Schutz induzieren und keine bzw. minimale Nebenwirkungen erzeugen.
- Besonders für die Anwendung in Ländern der dritten Welt sollte der Impfstoff kostengünstig produzierbar, leicht zu transportieren, zu lagern und zu applizieren sein.

Derzeit werden in der Impfstoffentwicklung verschiedene Ansätze zur Induktion einer aktiven Immunantwort verfolgt. Klassische und für zahlreiche Pathogene erfolgreiche Ansätze, wie die Applikation von inaktivierten Totvakzinen (z.B. Poliomyelitis-Impfung), attenuierten Erregern (z.B. Pocken-Impfung) oder Subunitvakzinen (z.B. Hepatitis B-Impfung) führten im Fall von HIV nicht zum erhofften Erfolg. In den letzten Jahren wurde daher mit großer Intensität an der Entwicklung von DNA-Impfstoffen gearbeitet. DNA-Impfstoffe bieten den Vorteil, neben der Induktion von Antikörpern auch das zelluläre Immunsystem zu aktivieren. Die Präsentation der Antigene als MHC I -Komplex auf der Zelloberfläche führt zur Induktion einer zytotoxischen T-Zell-Antwort und damit in Idealfall zur Lyse der infizierten Zellen. Zur Induktion einer solchen Immunantwort stehen dabei verschiedene replikationskompetente virale und nicht virale Vektorsysteme zur Verfügung. Durch das Einfügen entsprechender Leitsignale ermöglichen diese Systeme auch die Präsentation der Antigene auf der Zelloberfläche, ein besonders für die Induktion neutralisierender Antikörper gegen transmembrane Proteine vielversprechender Ansatz. Trotz höherer Effizienz viraler Systeme werden derzeit nicht-virale Vektoren bevorzugt, da diese nicht das Risiko der Insertionsmutagenese und damit die Induktion von Tumoren beinhalten. Tierversuche belegen die Wirksamkeit solcher Impfstoffe, wobei die Übertragung auf den Menschen noch zahlreiche Probleme birgt. Derzeit ist in Deutschland kein DNA-Impfstoff für die Anwendung in der Humanmedizin zugelassen. Auch die Entwicklung HIV-spezifischer DNA-Vakzine führte bisher noch nicht zum gewünschten Erfolg. Daher wird seit kurzem wieder verstärkt an der Entwicklung neuer Antigene zur Induktion einer neutralisierenden humoralen Immunantwort gearbeitet.

Da ein optimales HIV-Vakzin beide, die humorale und zelluläre Immunantwort stimulieren sollte, verspricht die Kombination beider Ansätze derzeit den größten Erfolg. Auch die Induktion einer effektiven Schleimhautimmunität könnte in diesem Zusammenhang zur Optimierung eines HIV-Vakzins beitragen.

Geeignete Antigene zur Induktion neutralisierender Antikörper

Transmembran- und Oberflächenhüllproteine sind entscheidend an der Infektion der Zielzelle beteiligt. Neben verschiedenen zellulären Proteinen sind sie die einzigen viralen Proteine, die auf der Oberfläche der Retroviren präsentiert werden und somit die bevorzugte Zielstruktur für die Induktion neutralisierender Antikörper. Obwohl auch neutralisierende Antikörper gegen das HIV-1-Gag-Protein und den zytoplasmatischen Teil des HIV-1-TM-Proteins gp41 sowie des FeLV-TM-Proteins p15E beschrieben wurden, sind diese Daten zumindest kritisch zu betrachten, da beide Strukturen im Inneren des Viruspartikels verborgen und während des Infektionsvorgangs für das humorale Immunsystem nicht zugänglich sind. Der Neutralisationsmechanismus solcher Antikörper ist völlig unklar. Für die mutmaßliche Existenz weiterer Transmembrandurchgänge der TM-Proteine des HIV-1 und des FeLV-A, die Strukturen des zytoplasmatischen Teils auf der Oberfläche exponieren, konnten keine Beweise erbracht werden.

Das Oberflächenprotein als Antigen zur Induktion neutralisierender Antikörper

Das Oberflächenhüllprotein der Retroviren, insbesondere von HIV, ist genetisch sehr variabel. Durch starke Glykosylierung, Konformation und Sequenzvariabilität bietet es nur wenige Angriffspunkte für neutralisierende Antikörper. Das SU-Protein des HIV-1, gp120, besteht bis zu 50% aus Zuckerresten und zählt damit zu den am stärksten bekannten glykolysierten Proteinen. Im Laufe einer Infektion werden hohe Titer an spezifischen Antikörpern gebildet, die jedoch nicht zur Neutralisation des Virus führen. Die hohe Sequenzvariabilität in den äußeren, dem Immunsystem zugänglichen Bereichen der Oberflächenproteine, führt zu einer raschen Bildung von Fluchtmutanten.

Allerdings konnte trotz der aufgeführten Fluchtmechanismen bei HIV durch die Immunisierung mit dem Oberflächenhüllprotein von Retroviren Immunität induziert werden.

In breiter Anwendung sind derzeit verschiedene FeLV-Impfstoffe, die aus Viruspräparationen isoliertes gp70 (z.B. Leukocell 2, Pfizer Inc., USA) oder rekombinantes p45 (Leucogen, Virbac AG, Schweiz; unglykosyliertes Oberflächenprotein des FeLV-A in *E.coli* exprimiert), enthalten. Keines der derzeit zugelassenen FeLV-Vakzine ist jedoch zu 100% effektiv, was eine jährliche Auffrischungsimpfung der zu schützenden Tiere erfordert. Auch gegen das gp120 des HIV-1 sind breit neutralisierende Antikörper beschrieben, die erfolgreich im passiven Immuntransfer eingesetzt wurden. Alle bisher in klinischen Studien eingesetzten HIV-Impfstoffe enthalten das Oberflächenhüllprotein gp120. Trotz intensiver Arbeiten ist die Induktion einer schützenden Immunantwort durch aktive Immunisierung mit dem Oberflächenhüllprotein bislang jedoch noch nicht gelungen.

Das Transmembranprotein als Antigen zur Induktion neutralisierender Antikörper

Die transmembranen Hüllproteine der Retroviren sind deutlich konservierter als deren Oberflächenhüllproteine. Im Gegensatz von bis ca. 35% Sequenzvariabilität innerhalb der Proteinsequenz der Oberflächenproteine zwischen den einzelnen Subtypen des HIV-1, beträgt die Sequenzvariabilität der Ektodomäne des gp41 zwischen den Subtypen maximal 15% (Gaschen et al., 2002, Abb.4.1). Die notwendigen Konformationsänderungen der Ektodomäne des TM-Proteins während des Infektionsvorganges erfordert eine hohe Sequenzstabilität. Nur wenige Aminosäureaustausche innerhalb der Helixregionen stören den Klappmechanismus und führen zum Verlust der Funktionalität. Somit ist das TM-Proteine zumindest in Hinsicht der Sequenzstabilität ein geeignetes Ziel zur Induktion von neutralisierenden Antikörpern.

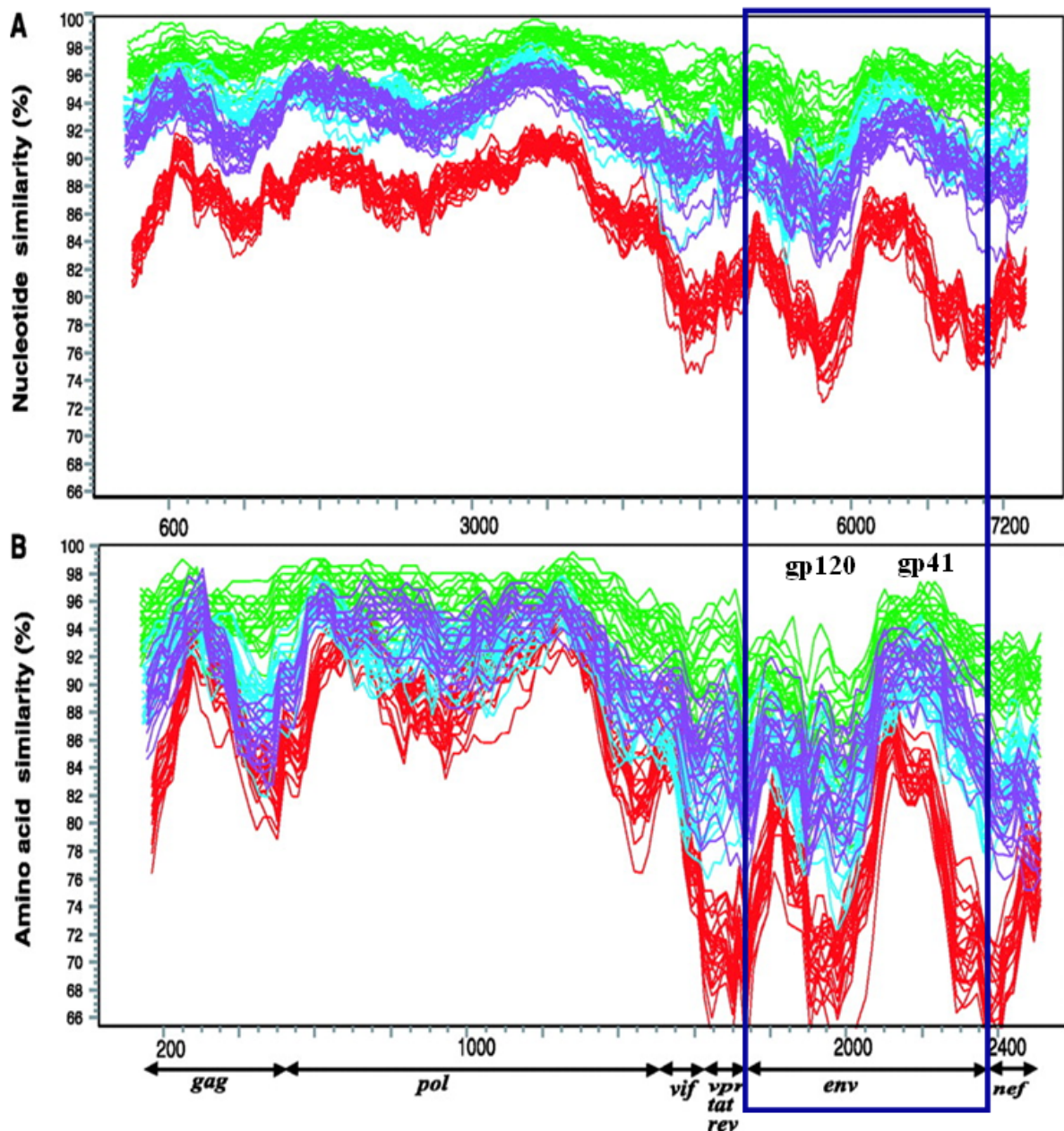


Abb. IV.1: Vergleich der Nukleinsäure- (Abb. A) und Aminosäuresequenzvariation (Abb. B) zwischen verschiedenen Isolatensubtypen C aus Südafrika, Botswana und Indien mit der Consensussequenz (der Subtypen B und C) und verschiedenen Impfstoffsequenzen (Gaschen et al., 2002).

Die grünen Graphen zeigen die Sequenzähnlichkeiten der verschiedenen Isolate zur Consensussequenz des Subtyps C, der rote zur Consensussequenz des Subtyps B. Die blauen Graphen verdeutlichen die Variabilität der Sequenzen zu den potentiellen Impfstämmen BR025 (hellblau) und ZA003 (blau). Die Sequenzbereiche der Env-Proteine sind eingerahmt. Die Abbildung verdeutlicht die hohe Sequenzvariabilität innerhalb des Oberflächenproteins von HIV-1 (bei Isolatensubtypen bis zu 20%, Subtypübergreifend bis zu 35%) und die deutlich stärkere Konservierung der Aminosäuresequenz in der Ektodomäne des Transmembranhüllproteins gp41.

Die Isolation der breit neutralisierenden, HIV-1-gp41-spezifischen Antikörper 2F5 und 4E10 scheint diese These zu unterstützen, obwohl eine Induktion solcher Antikörper durch aktive Immunisierung ebenfalls noch nicht gelungen ist.

Auch gegen die Transmembranhüllproteine verschiedener Gammaretroviren sind neutralisierende Antikörper beschrieben. Im Gegensatz zu den bislang erfolglosen Versuchen bei den Lentiviren, scheint hier die Induktion solcher Antikörper durch Immunisierung leichter möglich zu sein (Fiebig et al., 2003, Langhammer et al., 2005).

IV.2 Entwicklung eines PERV-Impfstoffs

Gammaretroviren sind als Pathogene in der Veterinärmedizin seit langem bekannt. In der Humanmedizin sind Gammaretroviren als Krankheitserreger bislang noch nicht beschrieben worden. Es scheint als gesichert, dass Gammaretroviren im Laufe der Evolution mehrmals die Speziesgrenzen überschritten haben (z.B. von Maus auf Katze bzw. auf das Schwein). In verschiedenen *in vitro*-Untersuchungen konnte eine Adaptation von PERV an humane Zellen beobachtet werden (Denner et al., 2003). Eine experimentelle *in vivo*-Übertragung von PERV in Tierversuchen oder in verschiedenen klinischen Studien zur Xenotransplantation wurde nicht beobachtet (Paradis et al., 1999; Specke et al., 2002). In Anbetracht der besonderen Situation während einer Xenotransplantation (Exposition porziner Organe im immunsupprimierten Organismus über mehrere Jahre), kann jedoch die Möglichkeit einer Adaptation an den Menschen mit daraus folgendem pathogenen Verlauf nicht sicher ausgeschlossen werden.

Induktion PERV-p15E-spezifischer Antikörper

Die Versuche zur Reaktivität der induzierten Ziegenserum (Ziege 16 und 20) zeigten, dass sowohl das rekombinante sowie das virale p15E detektiert werden. Damit wurde ein Ziel der Arbeiten, die Generation eines Kontrollserums gegen das PERV-TM-Protein für immunologische Nachweissysteme einer PERV-Infektion, erreicht. Unklar ist, inwieweit sich das zur Immunisierung eingesetzte rekombinante Konstrukt als Antigen in einem solchen Nachweissystem eignet, da nach dem derzeitigen Stand der Arbeiten nicht vorausgesagt werden kann, ob die während einer möglichen PERV-Infektion gebildeten p15E-spezifischen Antikörper (z.B. gegen die IDU-Domäne) das rekombinante Konstrukt binden können. Dies wäre jedoch mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zu erwarten, da zum Nachweis von

Infektionen eng verwandter Viren (HIV und FeLV) ähnliche Antigene bereits erfolgreich eingesetzt werden. Vorrangiges Ziel der Arbeiten war jedoch die Induktion neutralisierender Antikörper gegen das TM-Protein von Retroviren, daher wurden hierzu keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

Immunisierung durch die rekombinant generierte Ektodomäne von PERV-p15E

Durch Immunisierung mit der Ektodomäne des PERV-p15E konnte in zwei unterschiedlichen Spezies (neun Lewis-Ratten und zwei Ziegen) hohe Titer an bindenden Antikörpern induziert werden. In jedem durch rp15E erzeugten Immuns serum konnte PERV-neutralisierende Aktivität nachgewiesen werden. Der Neutralisationstiter der induzierten Seren beträgt bei einer Serumsverdünnung von 1:10 zwischen $1 \times 10^{1,21}$ und $1 \times 10^{1,96}$. Untersuchungen zur schützenden Immunantwort vor FeLV-Infektionen belegen, dass Seren, die bei einer Verdünnung von 1:2 *in vitro* neutralisierend wirken, einen effektiven Schutz vor einer Infektion bieten können. Ob der induzierte Titer an neutralisierenden Antikörpern einen ausreichenden Schutz zukünftiger Transplantatrecipienten bietet, kann noch nicht sicher geklärt werden, da derzeit kein geeignetes Tiermodell für einen solchen Versuch zur Verfügung steht. Die Identifizierung des PERV-Rezeptors und die Herstellung transgener Mäuse, die einen solchen Rezeptor tragen und somit mit PERV infizierbar sein sollten, stellt jedoch ein solches Tiermodell in naher Zukunft in Aussicht.

Ebenfalls finden derzeit Studien zur Immunisierung mit FeLV-p15E statt. Das dabei zur Immunisierung verwendete Konstrukt wurde analog zu dem rekombinanten PERV-p15E generiert. Die erzeugten Seren zeigten *in vitro* ebenfalls neutralisierende Aktivität (Langhammer et al., 2005). Der dazu in Vorbereitung befindliche *in vivo*-Versuch wird erste Hinweise auf die Effektivität des eingesetzten Antigens und der Möglichkeit des Einsatzes als Impfstoff geben.

Immunisierung mit p15E-abgeleiteten Peptiden

Die Verwendung von Peptidvakzinen kann im Vergleich zu in *E.coli* rekombinant hergestellten Antigenen zahlreiche Vorteile mit sich bringen. So entfällt z.B. die oft aufwändige und teure Abtrennung unerwünschter Nebenprodukte. Besonders hydrophobe

Proteine interagieren stark mit Bestandteilen der bakteriellen Zellwand (Lipopolysaccharide, LPS), die nur schwer vom gewünschten Produkt zu trennen sind. Die Abreicherung von LPS ist jedoch notwendig, da es im menschlichen Organismus zu schweren allergischen Reaktionen führen kann (Eisenbarth et al, 2002).

Ein weiterer Vorteil von Peptidvakzinen ist die Möglichkeit der gezielten Präsentation von neutralisierenden Strukturen. Dadurch kann die Induktion einer Immunantwort gegen für die Neutralisation nicht relevanter Bereiche des Antigens vermieden werden.

Auch die Inaktivierung der Funktionen des Antigens durch Deletion funktioneller Strukturen kann von Bedeutung sein. So sind die Schwierigkeiten bei der Entwicklung eines effektiven Impfstoffes gegen Botulismus (*Clostridium botulinum*) auf die außerordentlich hohe Toxizität des Botulinumtoxins zurückzuführen. Im Gegensatz zum strukturell eng verwandten Tetanustoxin (*Clostridium tetani*) führt die Applikation von formaldehydinaktivierten Antigen nicht oder nur zu sehr geringen Titern an neutralisierenden Antikörpern. In verschiedenen *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass die TM-Proteine der Retroviren einen Einfluss auf das Immunsystem ausüben. *In vitro* konnte die Modulation der Zytokinexpressionsmuster (Denner et al., 1998) und eine Proliferationshemmung humaner Lymphozyten nachgewiesen werden (Denner et al., 1994 und 1996). Peptide, die vom C-terminalen Bereich der N-Helix des Transmembranhüllproteins (immunsuppressive Domäne, ISU) abgeleitet wurden, zeigen einen ähnlichen Effekt. Dieser Effekt ist möglicherweise der Auslöser der oft mit einer retroviralen Infektion einhergehenden Immunsuppression des infizierten Organismus und wäre als Nebenwirkung einer Immunisierung natürlich unerwünscht.

Die hohen Titer an spezifischen Antikörpern, die durch die Immunisierung mit rp15E induziert wurden, lassen nicht auf eine signifikante Inhibition des Immunsystems bzw. der B-Zellproliferation schließen. Auch an den immunisierten Tieren wurden keine mit einer Immunsuppression korrelierbaren Symptome festgestellt. Diese Daten implizieren, dass durch die relativ geringe Menge und die geringe lokale bzw. zeitliche Begrenzung der Exposition des applizierten TM-Proteins im Organismus dieser Effekt vernachlässigt werden kann. Trotzdem wäre im Hinblick auf mögliche geringe Nebenwirkungen, die in den durchgeführten Versuchen nicht erfasst werden konnten, der Ausschluss der immunsuppressiven Domäne wünschenswert. Möglicherweise könnte dadurch auch eine noch effektivere Anregung der B-Zellproliferation erreicht werden, die zu Bildung höherer Titer an neutralisierenden Antikörpern führt.

Die von den Epitopen E1 und E2 abgeleiteten Peptide wurden in verschiedenen Formen Wistar-Ratten appliziert. Die Immunisierung mit freien 15mer-Peptiden führte,

wahrscheinlich aufgrund der geringen Molekülgröße des Antigens, zu keiner bzw. zu einer sehr schwachen Immunantwort. Ebenso führte die Kopplung der Peptide PERV-E1/E2 an BSA bzw. KLH als Trägermolekül nicht zur Induktion PERV-spezifischer Antikörper. In diesen beiden Fällen dürfte die geringe Kopplungseffizienz (durch SDS-PAGE konnte eine durchschnittliche Bindung vom maximal fünf Peptidmolekülen/Trägermolekül ermittelt werden) für die ausbleibende Immunantwort verantwortlich sein. Die Veränderung der Strukturen durch die Vernetzung der Moleküle kann als Ursache ausgeschlossen werden, da in den generierten Immunseren auch keine bindenden Antikörper gegen das zur Immunisierung eingesetzte Konjugat detektiert werden konnten.

Spezifische Antikörper gegen PERV-E1 bzw. E2 konnten durch die Immunisierung mit Dextran-Peptid-Konjugaten (mit und ohne funktionalen Linker) und durch über Cysteine vernetzte 25mer-Peptide induziert werden. Um eine möglichst variable Konformation zu gewährleisten, wurden die Peptide neben der relativ unspezifischen Kopplung an aktiviertes Dextran, auch über an den Enden angefügte Cysteine gekoppelt. Da unklar ist, ob die Interaktion beider Peptide auf eine spontane Zusammenlagerung durch intermolekulare Kräfte in wässriger Lösung beruht oder ob es erst im Paratop des Antikörpers zu einer Zusammenlagerung kommt, sollte die Verwendung des PDPH-Linkers eine spontane Ausrichtung der Peptide ermöglichen. Auch hier konnten relativ hohe Titer an bindenden Antikörpern induziert werden.

Keines der Immunseren zeigte jedoch virusneutralisierende Aktivität. Die Ursachen dafür sind unklar, wahrscheinlich ist aber, dass durch die verwendeten Kopplungsmethoden nicht die Konformation erzeugt werden konnte, wie sie im rekombinanten p15E vorliegt. In diesem Versuch wurde einer von vielen kommerziell angebotenen Linkern bzw. Kopplungsmethoden getestet. Möglicherweise verhindert der Abstand der Kopplungsstellen des aktivierten Dextrans die Bildung einer geeigneten Konformation. Durch die Verwendung alternativer Kopplungsmethoden, z.B. die gezielte Kopplung an trifunktionale Linker, könnte möglicherweise eine solche Konformation erzeugt werden.

Untersuchung des Bindungs- und Neutralisationsmechanismus PERV-neutralisierender Antikörper

Zur Untersuchung des Bindungs- und Neutralisationsmechanismus wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Aus der Summe der durch diese Experimente gesammelten Daten wurde ein Bindungs- und Neutralisationsmodell erstellt.

Die Epitopkartierung des Ziegenserums 20 zeigte zwei Antikörperbindungsstellen innerhalb der Ektodomäne von p15E. Von diesen identifizierten Epitopen wurden synthetische Peptide abgeleitet (PERV E1/E2). In den durchgeführten ELISA-Bindungsstudien wurden die Einzelpeptide, die Kombination beider Peptide und das zur Immunisierung eingesetzte rp15E adsorbiert. Geht man von der Induktion zweier getrennter Antikörperpopulationen aus, wäre durch Adsorption beider Peptide maximal ein additiver Effekt zu erwarten. In Anbetracht der Konkurrenz beider Antigene im gesättigten Bereich, könnte der zu erwartende Effekt sogar deutlich unter der Addition der Einzelwerte liegen. Beobachtet wurde jedoch eine deutlich synergistisch gesteigerte Bindung der im Serum enthaltenen Antikörper an die Kombination beider Peptide. Noch deutlicher kann dieser Effekt in Anwesenheit verschiedener Harnstoffkonzentrationen dargestellt werden. Aus diesen Daten wurde der Schluss gezogen, dass die Peptide PERV E1 und E2 miteinander interagieren und die Bindungsstärke zumindest einer im Serum enthaltenen Antikörperpopulation deutlich steigern. Ob neben dieser Population noch weitere, gegen die linearen Epitope gerichtete Antikörper im Serum enthalten sind, kann anhand dieses Versuches nicht ausgesagt werden.

Der im ELISA beobachtete Effekt weist auf eine Interaktion der identifizierten Sequenzen im N- bzw. im C-terminalen Bereich der Ektodomäne hin. Um zu untersuchen, ob die Antikörper, die mit der Kombination beider Peptide reagieren, an der Neutralisation beteiligt sind, wurde ein *in vitro*-Neutralisationsassay durchgeführt. Dieser Versuch zeigt, dass die Neutralisation nicht signifikant durch die Einzelpeptide gehemmt werden kann. Die Kombination beider Peptide führt dagegen zu einer Hemmung der Neutralisation, die der durch das rekombinante p15E annähernd entspricht. Aus diesem Versuch wird geschlossen, dass möglicherweise im Serum enthaltene Antikörper gegen lineare Epitope nicht virusneutralisierend wirken. Die Neutralisation beruht dagegen auf Antikörper, die mit hoher Affinität an die Kombination beider Peptide binden.

Durch Affinitätschromatographie konnten keine E1- bzw. E2-spezifischen Antikörper isoliert werden. Die eluierten Antikörper von beiden Säulen glichen in der Reaktivität dem Ausgangsmaterial. Eine Anreicherung von Antikörpern gegen eines der beiden Epitope wurde nicht beobachtet. Da der Versuch unter nativen Bedingungen durchgeführt wurde, wäre eine

Anreicherung auch schwach affiner Antikörper zu erwarten gewesen. Aus diesem Versuch wird geschlossen, dass durch die Immunisierung mit rp15E nur eine, die Kombination beider Peptide bindende, Antikörperpopulation induziert wurde.

Durch die Immunisierung mit freien bzw. an Dextran gekoppelten Peptiden wurden E1- bzw. E2-spezifische Seren induziert. Obwohl auch mit der Kombination beider Peptide immunisiert wurde, konnten ausschließlich Antikörper gegen lineare Epitope induziert werden. In keinem der induzierten Seren konnte neutralisierende Aktivität nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass gegen die linearen Epitope E1 bzw. E2 gerichteten Antikörper nicht neutralisierend wirken.

Durch einen *in vitro*-Neutralisationsassay konnte gezeigt werden, dass die Vorinkubation von PERV mit dem neutralisierenden Ziegen Serum 20 nicht zu einer Steigerung der Neutralisation führt. Der zu beobachtende leichte Abfall der Provirusintegration mit steigender Zeit der Vorinkubation ist nicht auf die gesteigerte Wirkung neutralisierender Antikörper zurückzuführen, da dieser auch im gleichen Maße in Anwesenheit des Präimmunserums zu beobachten ist. Mittels Immunfluoreszenz und FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Ziegen Seren 16 und 20 PERV-infizierte 293-Zellen detektieren. Dieser Befund legt nahe, dass die Epitope im sich abschnürenden Virus zugänglich sind und durch die induzierten Antikörper gebunden werden können. Warum eine Vorinkubation von Virus mit neutralisierenden Seren nicht, wie in den Versuchen mit 2F5 beobachtet, zu einer gesteigerten neutralisierenden Wirkung der Seren führt, ist unklar. Möglicherweise liegt der Grund hierfür in der äußerst schwach affinen Bindung der Antikörper an die Einzelepitope.

Die Sequenz des Epitops E2 ist bei den Gammaretroviren besonders stark konserviert. In diesem Bereich besteht eine 100%ige Übereinstimmung zu dem feline Leukämievirus (FeLV A). Das murine Leukämievirus (F-MuLV) zeigt einen Aminosäureaustausch. Selbst das phylogenetisch weiter entfernte Lentivirus HIV-1 (IIIB) zeigt noch eine 50%ige Homologie zum Epitop PERV-E2. Dagegen zeigt die Sequenz im E1-Bereich dieser Viren deutliche Abweichungen zur Sequenz des PERV (Tab. IV.1).

Obwohl das FeLV-p15E in der Western Blot Analyse durch das Ziegen Serum detektiert werden kann, wurde keines dieser Viren durch das PERV-neutralisierende Ziegen Serum 20 neutralisiert. Der Versuch zeigt, dass die Präsenz der Sequenz des E2-Epitopes allein nicht für eine Neutralisation ausreicht und die Stärke der Bindung einen entscheidenden Einfluss auf das neutralisierende Potential des Antikörpers hat.

Interessanterweise liegen die beschriebenen Epitope von 2F5 und 4E10 im membranproximalen Bereich der Ektodomäne, dem Bereich, in dem das PERV-E2-Epitop

lokalisiert werden konnte (Abb. III.5). Das für mAb 4E10 beschriebene Epitop weist sogar eine 50%ige Sequenzhomologie zu dem PERV-E2 auf (Tab. IV.1).

Tab. IV.1: Sequenzhomologie der Epitope E1 und E2 in verschiedenen Retroviren.

	Epitop E1	Epitop E2
PERV A:	LITG PQQL EKGLSNLHRIV	RRREREADQGW FEGW FNRS
F-MuLV:	ATQQF QQL HAAVQDDLKEV	QRKLFESSQGW FEG LFNRS
FeLV A:	ETAQFR QL QMAMHTDIQAL	RQQLFDSQQGW FEGW FNKS
HIV IIIB:	LTVQAR QL LSGIVQQQNNL	ELLE LDKWA SLLN NW FNIT

Bei den Gammaretroviren ist das Epitop E2 stark konserviert. Selbst das phylogenetisch weiter entfernte Lentivirus HIV-1 zeigt noch eine 50% Sequenzübereinstimmung. Obwohl der Bereich um Epitop E1 bei den verschiedenen HIV-Subtypen ebenfalls stark konserviert ist, besteht in diesem Bereich kaum Sequenzübereinstimmung zu anderen Retroviren. Die Epitope der HIV-neutralisierenden Antikörper 2F5 (ELDKWA) und 4E10 (NWFNIT) sind unterstrichen. Sequenzübereinstimmungen mit den Epitopen PERV-E1/E2 sind grau unterlegt.

Obwohl die Bindungsstellen dieser Antikörper scheinbar sehr gut charakterisiert sind, ist eine Induktion neutralisierender Antikörper gegen den membranproximalen Bereich der Ektodomäne bis heute nicht gelungen. Die Tatsache, dass durch Immunisierung mit Peptiden, die den Epitopen 2F5 und 4E10 entsprechen, keine neutralisierenden Antikörper induziert werden können, legt die Vermutung nahe, dass möglicherweise auch diese Antikörper Konformationsepitope bzw. konformationsabhängige Strukturen binden. Der für das Transmembranprotein von Retroviren beschriebene Klappmechanismus während des Infektionsvorganges führt zu einer räumlichen Annäherung der Sequenzen PERV-E1 und PERV-E2. Die Bildung eines metastabilen Konformationsepitopes durch die identifizierten Bereiche E1 und E2 innerhalb der Sechs-Helix-Konformation ist daher denkbar.

Da ein endgültiger Beweis für die Bildung eines neutralisierenden Konformationsepitops noch nicht erbracht ist, sollen die durch die durchgeführten Experimente gesammelten Hinweise im Folgenden zusammengefasst werden:

- Synergistische Bindung PERV-spezifischer Antikörper an die Kombination der Peptide PERV E1/E2 im ELISA.
- Hemmung der neutralisierenden Aktivität des Ziegenserums 20 durch die Kombination der Peptide PERV E1/E2, jedoch nicht durch die Einzelpeptide.
- Keine Trennung von Antikörperpopulationen durch Affinitätschromatographie gegen die synthetischen Peptide PERV E1 bzw. E2 möglich.
- Seren, die bindende Antikörper gegen die Peptide PERV E1 oder PERV E2 enthalten, sind nicht neutralisierend.
- FeLV-A, das zu 100% das PERV-E2 (FEGWFN) enthält, in der E1-Sequenz jedoch keine Homologien aufweist, kann durch das Ziegenserum 20 nicht neutralisiert werden.

Aus diesen Daten wurde ein Bindungs- und Neutralisationsmodell für die durch rp15E induzierten neutralisierenden Antikörper erstellt. Da für den Infektionsvorgang des porzinen endogenen Retrovirus keine Daten veröffentlicht sind, werden Daten gängiger HIV-Modelle zugrunde gelegt (Abb. I.5 und Abb. IV.2)

A: Die wenig averse Bindung an die von den identifizierten Epitopen abgeleiteten Einzelpeptide suggeriert, dass die Antikörper nicht oder nur sehr schwach das freie Virus binden. Wahrscheinlicher Grund hierfür ist die räumliche Trennung der Bereiche E1 und E2 vor der Ausbildung der Sechshelix-Struktur. Denkbar ist auch die sterische Hinderung durch das Oberflächenprotein, die den Zugang der Antikörper zur Bindungssequenz erschwert.

B: Die Bindung des Oberflächenproteins (gp70) an den zellulären Rezeptor führt zu Konformationsänderungen und zum Eindringen des Fusionspeptides in die Wirtszellmembran.

C: Die Konformationsänderungen durch die Bindung des zellulären Rezeptors und das Eindringen des Fusionspeptides in die Wirtsmembran führt zur Ablösung des Oberflächenproteins. Die Freilegung stark hydrophober Sequenzen innerhalb der Ektodomäne des TM-Proteins führt zur Ausbildung der CHR-Helix. Die Bereiche E1 und E2 befinden sich nun in räumlicher Nähe.

D: Der neutralisierende Antikörper bindet mit hoher Affinität an die durch das von den Bereichen E1 und E2 neu gebildete Konformationsepitop und verhindert die Ausbildung einer Fusionspore. Das Virus wird am Eindringen in die Wirtszelle gehindert.

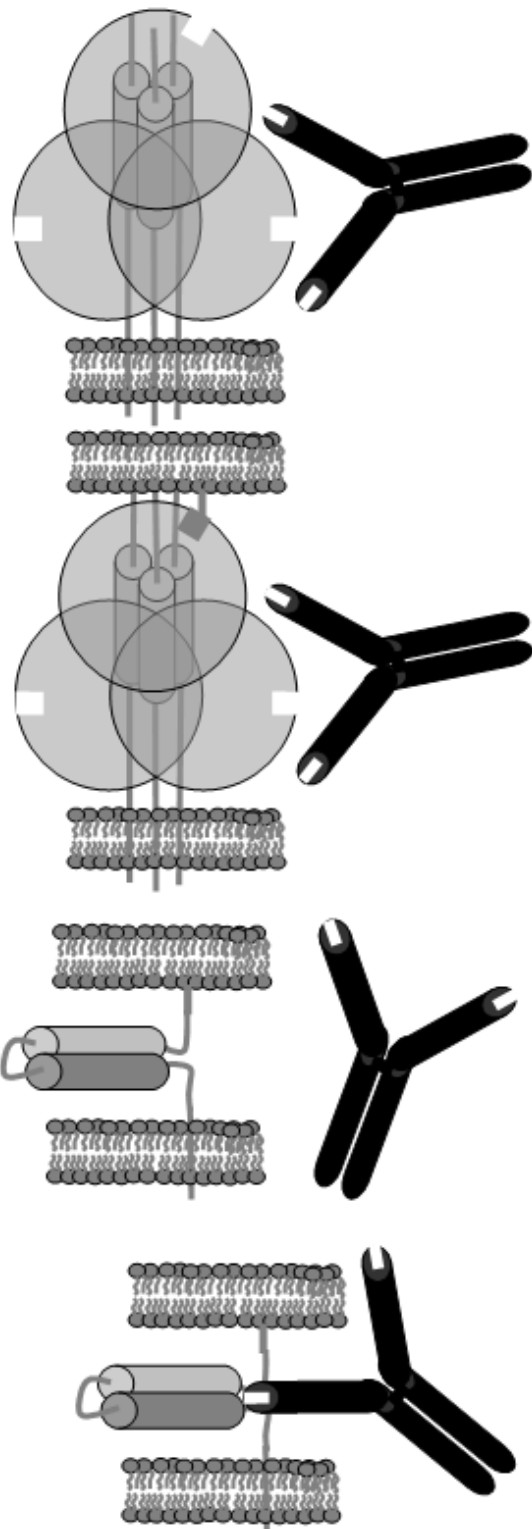


Abb. IV.2: Bindungs- und Neutralisationsmodell für PERV-neutralisierende Antikörper.

Den während der Infektion ablaufenden Konformationsänderungen des Oberflächenkomplexes wurden HIV-Daten zugrunde gelegt (Sackett et al., 2003). Das Bindungsmodell wurde auf Grundlage der experimentellen Daten erstellt. In den Abbildungen C und D ist das p15E (das in dieser Phase als Sechshelix-Bündel vorliegt) aus Gründen der Übersichtlichkeit als Monomer dargestellt.

Präventive Vakzinierung zukünftiger Transplantatempfänger mit rp15E?

Die in diesem Projekt durchgeführten Arbeiten zur Induktion PERV-neutralisierender Antikörper zeigten, dass Induktion eines Impfschutzes gegen PERV auf Basis des TM-Proteins möglich ist.

Ob jedoch die allgemeinen Anforderungen an einen effektiven Impfstoff erfüllt werden ist noch unklar. Nach derzeitigem Stand der Experimente erfüllt das zur Immunisierung eingesetzte rp15E-Konstrukt einige der grundlegenden Anforderungen an einen Impfstoff.

Bei 100% der Versuchstiere konnten Seren mit neutralisierender Aktivität induziert werden. Dieser Versuch wurde jedoch in einem artifiziellen System durchgeführt. Da ein geeignetes Tiermodell nicht zur Verfügung steht, kann durch diese Versuche keine Aussage getroffen werden, ob die induzierten Antikörper einen effektiven Schutz vor einer Infektion des Organismus bieten.

Die Blutentnahmen eines Versuchstieres (Ziege 20) erfolgten regelmäßig über einen Zeitraum von 24 Monaten. Es erfolgte keine zwischenzeitliche Auffrischung der Immunisierung. In diesem Zeitraum wurde kein signifikanter Abfall des Neutralisationstiter im Serum beobachtet. Obwohl sich anhand eines Tieres keine allgemeine Aussage treffen lässt, kann festgestellt werden, dass in diesem Tier ein konstant hoher Titer an neutralisierenden Antikörpern über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten wurde.

Bei keinem der Versuchstiere wurden Nebenwirkungen beobachtet. Obwohl die Tiere unter ständiger Beobachtung standen, kann selbstverständlich über die klassischen leichten Nebenwirkungen einer Impfung (Gliederschmerzen, Unwohlsein usw.) keine Aussage getroffen werden. In Anbetracht der durch die Xenotransplantation notwendigen Immunsuppression und der damit verbundenen schweren Nebenwirkungen sind eventuelle leichte Nebenwirkungen einer Impfung wohl zu vernachlässigen. Auch die Frage der Kosten einer Immunisierung sowie der Lagerung und des Transportes eines PERV-Impfstoffes dürfte angesichts des enormen technischen und finanziellen Aufwandes einer Xenotransplantation eine untergeordnete Rolle spielen.

PERVs sind integraler Bestandteil des Genoms aller porciner Zellen. In den Seren der Schweine konnten bislang keine PERV-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Obwohl PERVs unter natürlichen Bedingungen nicht oder nur sehr schwach exprimiert werden, könnte eine Immunisierung gegen porcine Proteine möglicherweise zu unerwünschten Abstoßungsreaktionen des Transplantats führen. Die durchgeführten Versuche

weisen jedoch darauf hin, dass die induzierten Antikörper gegen ein Epitop gerichtet sind, das vornehmlich während des Infektionszyklus präsent ist. Ob die schwachaffine Bindung der Antikörper zur Schädigung des Transplantats führen könnte, muss in weiteren Versuchen untersucht werden.

IV.3 Entwicklung eines HIV-Impfstoffs

Die Notwendigkeit der Entwicklung eines präventiven HIV-Impfstoffes ist angesichts von 40 Millionen Infizierten, 15000 Neuinfektionen und 8000 Toten pro Tag unbestritten. Die unter 4.1. diskutierten allgemeinen Anforderungen an einen Impfstoff sind nach über zwanzig Jahren intensiver, aber weitestgehend erfolglosen Bemühungen zur Entwicklung eines effektiven Impfstoffs und der verheerenden Folgen für die soziale und ökonomische Infrastruktur der betroffenen Regionen differenzierter zu sehen. Der Schutz eines Teiles der Bevölkerung vor dem regional vorherrschenden Subtyp wäre ein großer Erfolg. In Anbetracht der enormen Kosten von Aufklärungskampagnen, der Belastung der Gesundheitssysteme durch die hohe Zahl der Kranken sowie des extremen Rückgangs des Bruttosozialprodukts stark durchseuchter Gebiete, dürfen die Kosten einer Impfung nicht im Vordergrund stehen. Es ist im Interesse der gesamten Weltgemeinschaft, die dafür erforderlichen finanziellen Mittel bereitzustellen.

Untersuchung des Bindungs- und Neutralisationsmechanismus von 2F5

Der breitneutralisierende, gegen das TM-Protein von HIV-1 gerichtete Antikörper 2F5, wurde 1993 aus einem HIV-1-infizierten Patienten isoliert (Zwick et al. 1993). Dieser Antikörper bindet eine Sequenz (ELDKWA) nahe des Transmembrandurchgangs im C-terminalen Bereich der gp41-Ektodomäne. Im *in vitro*-Neutralisationsassay inhibiert 2F5 die Replikation verschiedener HIV-1-Subtypen in sehr geringen Konzentrationen. Neben 2F5 konnte mit dem monoklonalen Antikörper 4E10 ein weiterer, gegen diesen Bereich gerichteter Antikörper mit ähnlichem Neutralisationsspektrum aus einem infizierten Patienten isoliert werden (Zwick et al. 2001, Stiegler et al., 2001). Untersuchungen belegen, dass Seren HIV-positiver Patienten, die Antikörper gegen den membranproximalen Bereich der Ektodomäne enthalten, einen höheren Neutralisationstiter zeigen als Seren, die diesen Bereich nicht erkennen (Calarota et

al. 1996; Geffin et al., 1998). Auch die guten Ergebnisse in Studien zum passiven Immuntransfer mit 2F5 deuten auf das hohe Potential dieses Antikörpers hin (Stiegler 2002).

Eine Induktion solcher Antikörper durch aktive Immunisierung ist trotz zahlreicher Versuche jedoch noch nicht gelungen (Lu et al. 2000; Joyce et al., 2002; Coëffier et al., 2001). Der Grund dafür könnte im bisher noch nicht vollständig verstandenen Bindungs- und Neutralisationsmechanismus liegen, der wichtige Hinweise auf die notwendige Beschaffenheit geeigneter Antigene geben könnte.

In der Western Blot Analyse und im ELISA wurde beobachtet, dass 2F5 geringe Mengen der gp41-Ektodomäne deutlich besser bindet als an größere Mengen des linearen Peptides DP178. Verschiedene Studien zeigen, dass die an ELDKWA angrenzenden Aminosäuren einen Einfluss auf die Bindungsstärke haben (Ernst et al., 1998; Coëffier et al., 2001). In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde dieser bindungssteigernde Effekt jedoch auch bei Verwendung des längeren Peptids DP178 (35mer) und dem ELDWA-enthaltenen Peptid NIH-6373 (15mer) beobachtet. Daher wird ein Einfluss der im DP178 enthaltene Aminosäuren auf die Konformation des 2F5-Epitops als Ursache für die Bindungssteigerung ausgeschlossen (Ernst et al. 1998).

Das anhand der Untersuchungen PERV-neutralisierender Antikörper erstellte Bindungs- und Neutralisationsmodell suggeriert die Existenz einer zweiten, am 2F5-Epitop beteiligten Sequenz im N-terminalen Bereich der Ektodomäne. In den hier durchgeführten Bindungsstudien mit überlappenden Peptiden, die den gesamten Env-Komplex umfassen, konnte erstmals eine Sequenz identifiziert werden, die die Bindung von 2F5 an das ELDKWA-Epitop deutlich steigert und nicht in direkter Nachbarschaft dieser Bindungsstelle liegt. Die identifizierte Sequenz ist, wie anhand des PERV-Modells vorausgesagt, im N-terminalen Bereich der Ektodomäne lokalisiert. Im Unterschied zu dem untersuchten PERV-p15E-spezifischen Antikörpern, binden 2F5 und 4E10 das vom HIV-E1-Bereich abgeleitete Peptid nicht im ELISA oder auf der Pepspot-Membran. Das legt die Vermutung nahe, dass die identifizierte Sequenz nicht direkt oder nur schwach an der Bildung eines Konformationsepitopes beteiligt ist, sondern durch Wechselwirkungen mit der ELDKWA-Sequenz entscheidenden Einfluss auf die Konformation des 2F5-Epitopes nimmt.

Diese These konnte durch die Versuche zum optimalen stöchiometrischen Verhältnis gestützt werden. Das ermittelte optimale Verhältnis der Peptide HIV-E1 zu HIV-E2 beträgt 2:1. Dieses Verhältnis kann mit der bereits beschriebenen trimeren Struktur des Oberflächenkomplexes sehr gut erklärt werden.

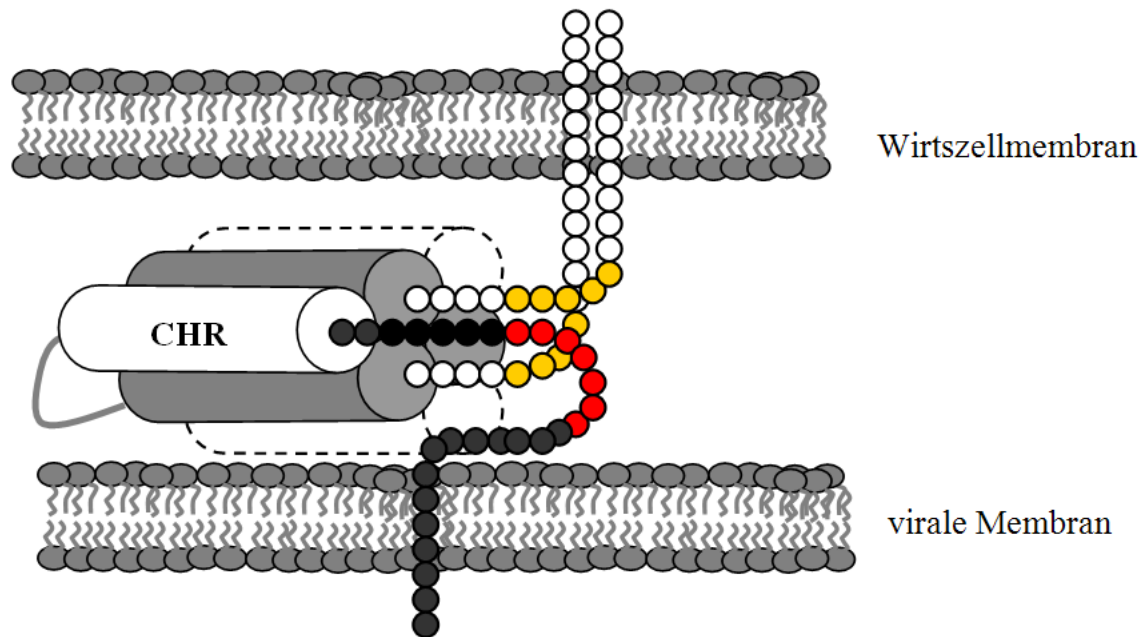


Abb. IV.3: Schematische Darstellung der gp41-Ektodomäne in der für die Neutralisation durch 2F5 relevanten Struktur.

Dargestellt ist die Sechs-Helix-Konformation, die nach dem Eindringen des Fusionspeptids in die Zielzelle und der darauf folgenden Ausbildung der CHR-Helix entsteht. In die von den N-terminalen Helices (graue Zylinder) gebildete Furchen lagern sich die C-terminalen Helices (weißer Zylinder) ein. Die Lage des 2F5-Epitops ist rot, die der interagierenden „E1-Bereiche“ gelb gekennzeichnet. Durch einen mit der viralen Membran interagierenden tryptophanreichen Bereich wird das 2F5-Epitop in eine Typ I β -Turn-Konformation gefaltet.

Einfluss der Vorinkubation von HIV und 2F5

Der Komplex aus Oberflächen- und Hüllprotein durchläuft während des Infektionsvorgangs mehrere Konformationsänderungen. Das Hüllprotein ist im nativen Virus zum großen Teil vom Oberflächenprotein maskiert und wird erst nach der Anlagerung des Fusionspeptides in die Zielzellmembran, durch Ablösung des Oberflächenproteins, freigelegt. Der tryptophanreiche Bereich in unmittelbarer Nähe des 2F5-Epitops ist für die Fusion unerlässlich (Munoz-Barroso et al., 1999; Salzwedel et al., 1999) und unterliegt während des Fusionsprozesses mehreren Konformationsänderungen. Sattentau et al. (1999) konnten zeigen, dass 2F5 sein Epitop bereits vor der Bindung des CD4-Rezeptors bindet. Diese Daten werden durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zum Einfluss der Vorinkubation gestützt. Die Vorinkubation bis zu ca. 45min führt zu deutlich gesteigerten virusneutralisierenden Wirkung von 2F5. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass bereits im nativen Virus das 2F5-Epitop zugänglich ist und durch den Antikörper gebunden werden

kann. Ob die identifizierte stabilisierende Sequenz im N-terminalen Bereich bereits in dieser Phase in räumlicher Nähe zum 2F5-Epitop vorliegt oder ob die Bindung des Antikörpers nach der Ausbildung der C-Helices stabilisiert wird, kann durch diesen Versuch nicht beantwortet werden. Sicher scheint, dass 2F5 nicht die Anlagerung von gp120 an den CD4-Rezeptor unterbindet (Ugolini et al., 1997; Nyambi et al., 2000; Barbato et al., 2003).

Ein analog durchgeführter Versuch zur Vorinkubation PERV-neutralisierender Antikörper mit Virus führte zu keiner messbaren gesteigerten Neutralisation. Durch Immunfluoreszenz und FACS-Analyse konnte jedoch auch hier die Zugänglichkeit der membranproximalen Bereiche vor der Rezeptorbindung gezeigt werden.

Bindungs- und Neutralisationsmodell für 2F5

Durch Bindungsstudien mit 2F5 konnte eine Sequenz im N-terminalen Bereich der Ektodomäne identifiziert werden, die an der Bindung von 2F5 an gp41 beteiligt ist. Dieses Ergebnis unterstützt das anhand PERV-neutralisierender Antikörper erstellte Bindungs- und Neutralisationsmodell.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich beim HIV-1-Bereich um eine bindungsunterstützende Sequenz handelt, die durch den Antikörper nicht direkt gebunden werden kann, die Avidität des Antikörpers an das ELDKWA-Epitop jedoch deutlich erhöht. Für die Bindung eines Konformationsepitopes durch die Bereiche E1 und E2 konnte kein experimenteller Beweis erbracht werden.

Da über Konformation des gp41 vor der Ablösung des Oberflächenproteins keine gesicherten Daten vorliegen, ist die Ausrichtung beider Bereiche im nativen Virus jedoch unklar. Sicher ist jedoch, dass gp41 im nativen Virus in einer „geöffneten“ Form vorliegt. Wild et al., (1995) konnte die Fusionshemmung durch von der CHR-Helix abgeleiteten Peptiden (T20, DP178, C36) zeigen, die durch Anlagerung an die NHR-Helix die Ausbildung der Sechshelix-Struktur stören. Diese Daten legen nahe, dass es erst durch Konformationsänderungen während des Infektionszyklus zur Annäherung der beiden Bereiche kommt.

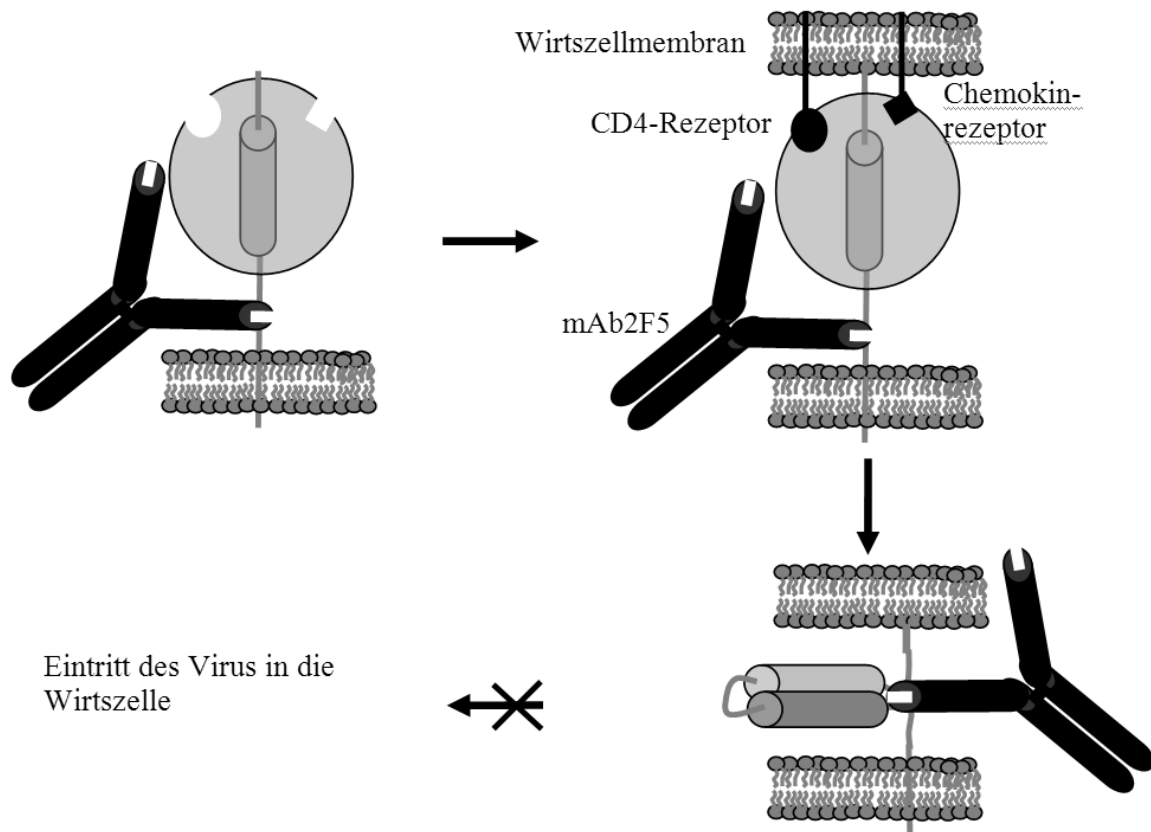


Abb. IV.4: Schematische Darstellung der Bindung von 2F5 in zwei Stufen.

2F5 kann das native Virus binden, verhindert aber nicht die Bindung des CD4- und des Korezeptors. Die Bindung ist jedoch von relativ geringer Affinität. Erst nach dem Eindringen des Fusionspeptides und der Ausbildung der Sechs-Helix-Konformation kommt es zur räumlichen Annäherung der E1-Sequenz. Die mit den Vorgängen verbundenen Konformationsänderungen ermöglichen die hochaffine Bindung des Antikörpers. Weitere, für die Membranverschmelzung notwendige Konformationsänderungen werden somit unterbunden.

Auf Basis der vorliegenden Daten wurde ein zweistufiges Bindungsmodell für 2F5 aufgestellt. Das 2F5-Epitop ist danach bereits im nativen Virus frei zugänglich und wird durch den Antikörper gebunden. Die Bindung des CD4-Rezeptors durch gp120 sowie der Klappmechanismus des gp41 wird durch die Antikörperbindung nicht unterbunden (Suttentau et al., 1999; Ugolini et al., 1997; Golding et al., 2002). Da nur selten neutralisierende Antikörper gegen dieses Epitop in HIV-infizierten Patienten detektiert werden können (Calarota et al., 1996), scheint die Exposition eines neutralisationskompetenten Epitops in freien Viruspartikeln unwahrscheinlich. Diese Daten sprechen für einen Bindungsmechanismus, wie er für PERV-neutralisierende Antikörper aufgestellt wurde. Die teilweise unterschiedlichen experimentellen Daten könnten auf die unterschiedliche Beschaffenheit der Paratope neutralisierender Antikörper zurückzuführen sein. Während die PERV-neutralisierenden Antikörper der Ziege 20 direkt an ein Konformationsepitop binden,

bindet 2F5 lediglich an das ELDKWA-Epitop, das jedoch in seiner Konformation entscheidend von der E1-Sequenz beeinflusst wird.

Immunisierung mit rekombinanten gp41

Analog zu den Immunisierungsversuchen mit dem transmembranen Hüllprotein von PERV wurde die gp41-Ektodomäne rekombinant als CBP-Fusionsprotein generiert und zur Immunisierung eingesetzt. Die Epitopkartierung der gp41-spezifischen Antikörper zeigt, ähnlich wie im Fall der PERV-spezifischen Seren, ein relativ homogenes Bild in der Lokalisation der Antikörperbindungsstellen (Abb. III.18), abhängig vom eingesetzten Antigen. Durch diese Immunisierung konnten zwar hohe Titer an gp41-bindenden, jedoch keine neutralisierenden Antikörper induziert werden. Der Grund hierfür könnte in der abweichenden Lokalisation der immunreaktiven Regionen im rgp41 im Vergleich zum rp15E liegen (Abb. IV.5). Die Epitopkartierung der Immunseren zeigt, dass in allen Seren Antikörper gegen den N-terminalen E1-Bereich induziert wurden. Es konnten auch Antikörper gegen den CHR-Bereich nachgewiesen werden, wobei die Bindungsstellen dieser Antikörper deutlich weiter N-terminal, in der Helixregion gelegen sind. Gegen die Regionen um das 2F5- oder das 4E10-Epitop (E2-Bereich) konnten keine Antikörper induziert werden. In Bindungsstudien konnte zwischen diesen beiden detektierten Epitopen keine Interaktion nachgewiesen werden.



Abb. IV.5: Vergleich der Lokalisation der Epitope neutralisierender und induzierter Antikörper innerhalb der HIV-gp41- und PERV-p15E-Ektodomäne

Die Bindungsstellen der induzierten Antikörper sind durch graue Rechtecke markiert, die Bindungsstellen der HIV-neutralisierenden, monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10 sind unterstrichen. Der Cysteinloop ist durch einen schwarzen Bogen gekennzeichnet.

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass die Ektodomäne von gp41 in dieser Form nicht zur Induktion neutralisierender Antikörper geeignet ist. Die einfache Ableitung eines gp41-Konstruktes zur Induktion neutralisierender Antikörper vom rekombinanten PERV-p15E ist also nicht möglich.

Auch durch die Immunisierung mit dem gp41 der Firma Roche konnten keine neutralisierenden Antikörper induziert werden. Wie bei der Immunisierung mit CBP-gp41, wurden durch das Roche-gp41 Antikörper gegen den E1-, jedoch nicht gegen den E2-Bereich induziert.

Immunisierung mit von HIV-E1/E2 abgeleiteten Peptiden

Da eine Induktion gegen E1/E2-gerichteter Antikörper durch die rekombinant hergestellte Ektodomäne von gp41 nicht gelungen ist, wurde ein Ansatz mit synthetischen Peptiden gewählt.

Um die membranproximale Region (2F5 und 4E10-Epitop) zu der bindungssteigernden E1-Sequenz in räumliche Nähe zu bringen, wurden verschiedene Ansätze gewählt. Alle Versuche basieren auf von E1 und E2-abgeleiteten synthetischen Peptiden. Die Ergebnisse der Versuche deuten auf eine Interaktion beider Peptide in wässrigen Lösungen hin. Da eine für die Induktion neutralisierender Antikörper korrekte Ausrichtung der Peptide zueinander schwierig durch eine starre Kopplung zu erreichen ist, wurde bewusst auf die Abtrennung ungekoppelter Peptide verzichtet. Dadurch sollte die Anlagerung freier Peptide an bereits gekoppelte Peptide ermöglicht werden. Durch diesen Versuchsaufbau ist eine präzise Analyse des zur Immunisierung eingesetzten Konstrukts jedoch nicht möglich.

Es konnte in zwei Seren HIV-neutralisierende Aktivität nach den festgelegten Kriterien ($\Delta\text{ct} > 2$) nachgewiesen werden. Die Hemmung der HIV-Replikation lag bei einer Serumsverdünnung von 1:16 zwischen 95% (Rattenserum Q3) bis 99% (Rattenserum S3). Damit entspricht die neutralisierende Aktivität dieser Seren etwa der des mAb2F5 in einer Konzentration von 10 µg/ml. Ratte Q3 ist eins von drei mit den freien Peptiden (HIV-E1/E2), Ratte S3 eins von drei mit E1/E2-PDPH-Dex6 immunisierten Versuchstieren. Da freie Peptide nicht abgetrennt wurden, können die induzierten Antikörper im S3-Serum nicht auf das E1/E2-PDPH-Dex6-Antigen zurückgeführt werden. Die Hemmung der Provirusintegration durch die Immunseren aller anderen Versuchstiere kann nicht als signifikant eingestuft werden.

Das verwendete Testsystem zur Detektion neutralisierender Antikörper erwies sich im Laufe der Experimente als stabil. Trotzdem kann die Hemmung der Virusreplikation in einem *in vitro*-Neutralisationsassay auf vielfältige Ursachen zurückgehen. Zum Beispiel wird durch eine Immunisierung auch die Bildung von Chemokinen und Cytokinen induziert, die eine unspezifische Hemmung der Infektion als Folge haben können. Auch geringe Kontaminationen mit bakteriellen Bestandteilen (z.B. LPS) kann zur Proliferationshemmung oder sogar zu zytotoxischen Effekten führen. Die unvollständige Inhibition des Komplementsystems kann ebenfalls falsch positive Ergebnisse hervorrufen.

Da neben den aufgezählten noch eine Reihe weiterer Störungen des Systems denkbar wären, wurden zur Absicherung der Daten umfangreiche Kontrollexperimente durchgeführt:

- Nur aus den Immunseren isolierte IgG's hemmen die Virusreplikation Aus Präimmunserum und Immunserum wurden affinitätschromatographisch Immunglobuline der Klasse G bzw. TM-Protein-bindende Antikörper isoliert. Erwartungsgemäß konnten aus dem Präimmunserum keine virusspezifischen Antikörper isoliert werden. Die Virusreplikation wurde nur durch aus den Immunseren isolierte Antikörper gehemmt.
- Die neutralisierende Aktivität der Immunseren kann durch E1/E2 abgeleitete Peptide gehemmt werden. Dieses Ergebnis weist auf die Hemmung der Virusreplikation durch E1/E2-spezifische Antikörper hin.
- Die HIV-spezifischen Seren der Ratten S3 und Q3 hemmen die HIV-Replikation, jedoch nicht die Replikation des eng verwandten porzinen endogenen Retrovirus. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die neutralisierende Wirkung der Seren HIV-spezifisch ist. Ein unspezifischer Effekt durch Chemokine oder Zytokine ist daher unwahrscheinlich.

Unklar ist, warum eine solche neutralisierende Immunantwort nur in wenigen Versuchstieren induziert werden konnte. Möglicherweise liegt der Grund hierfür in dem zur Immunisierung eingesetzten, relativ heterogenen Gemisch von freien, zusammengelagerten und gekoppelten Peptiden. In diesem Gemisch könnte eine Vielzahl verschiedener Konformationen zur Induktion von Antikörpern unterschiedlicher Spezifität führen.

In Versuchen zur Bestätigung der Ergebnisse wurden zehn Wistar-Ratten nach gleichen Immunisierungsschema mit freien Peptiden immunisiert. In keinem der induzierten Seren konnte HIV-neutralisierende Aktivität nachgewiesen werden. Trotz analoger Versuchsdurchführung zeigen die in den Folgeversuchen generierten Seren deutliche

Unterschiede in der Verteilung der Antikörperbindungsstellen (analysiert durch Epitopkartierung) und demzufolge auch keine virusneutralisierende Aktivität. Auch der Titer an bindenden Antikörpern war im Vergleich zum ersten Immunisierungsversuch deutlich geringer. Die Ursachen der unterschiedlichen Versuchsergebnisse ist noch unklar.

Veröffentlichungen zeigen, dass 2F5 über eine besonders lange CDR3-Schleife (22 Aminosäuren) verfügt. Die durchschnittliche Länge der CDR3-Schleife humaner IgGs beträgt etwa 13 Aminosäurereste, die muriner IgGs 9-10 und die von Kaninchen 11-12 Aminosäurereste (Wu et al., 1993). Eine lange CDR3-Schleife weist auf eine Antikörperreife im Patienten hin (Kunert et al., 1998), wobei der Zeitpunkt des Auftretens solcher Antikörper wahrscheinlich der statistischen Zufälligkeit unterliegt. Die Bedeutung dieser langen CDR3-Schleife für die neutralisierende Aktivität von 2F5 wurde durch Untersuchungen von Zwick et al. (2004) belegt. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Aminosäureaustausche innerhalb der CDR3-Schleife von 2F5 zu einer Verringerung der neutralisierenden Aktivität der Antikörper bis zu 90% führt.

Aus diesen Studien muss geschlossen werden, dass das hier verwendete Rattenmodell für die Induktion 2F5-ähnlicher Antikörper möglicherweise nur bedingt geeignet ist. Die Induktion von Antikörpern mit besonders langen CDR3-Schleifen in Ratten ist relativ selten, was auch die geringe Anzahl neutralisierender Immunsereen innerhalb der einzelnen Immunisierungsgruppen erklären könnte. Die Verwendung eines Kaninchenmodells könnte so möglicherweise zu deutlich besseren Ergebnissen führen.

Kann durch aktive Immunisierung Schutz vor einer HIV-Infektion induziert werden?

Die Isolation breitneutralisierender Antikörper (2F5/4E10) aus infizierten Patienten zeigt, dass die Induktion neutralisierender Antikörper gegen den membranproximalen Bereich der gp41-Ektodomäne generell möglich ist. Diese These konnte durch die bisher durchgeführten Arbeiten grundsätzlich bestätigt werden. Auf Basis des Wirkmechanismus von 2F5 wurden Immunisierungsstudien durchgeführt, die zur Induktion neutralisierender Seren geführt haben. Obwohl nur in einem sehr geringen Teil der Versuchstiere neutralisierende Antikörper induziert wurden, die Reproduktion der Ergebnisse und der Test gegen Primär-isolate noch aussteht, ist es erstmals gelungen, neutralisierende Antikörper gegen diesen Bereich zu induzieren. Die Daten lassen hoffen, dass durch weitere intensive Forschungsarbeiten die Konstruktion von Antigen gelingt, die eine verlässliche Induktion solcher Antikörper

gewährleisten. Die Ergebnisse der Studien zum passiven Immuntransfer im Menschen, SCID-Mäusen (*severe combined immune deficiency*) und Rhesusaffen zeigen die Effizienz solcher Antikörper (Stiegler et al., 2002; Gauduin et al., 1997). Wenn auch nach dem derzeitigen Kenntnisstand nicht sicher ist, dass so eine sterile Immunität im Menschen induziert werden kann, stellt die Induktion neutralisierender Antikörper auf Basis des hier erstellten Bindungsmodells einen viel versprechenden Ansatz dar.

IV.4 Ausblick

In Fortführung der bereits begonnenen Untersuchungen zur Entwicklung eines präventiven Impfstoffes zur Vakzinierung zukünftiger Xenotransplantatempfänger mit PERV-rp15E, wird derzeit die Etablierung eines geeigneten Tiermodells zur Prüfung des Impfstoffes *in vivo* vorangetrieben. In Zusammenarbeit mit dem Scripps Research Institute, La Jolla, werden transgene Mäuse, die den Rezeptor von PERV exprimieren, auf ihre Infizierbarkeit mit PERV getestet. Mauszellen haben diesen Rezeptor nicht und können deshalb nicht mit PERV infiziert werden. Wenn die transgenen Tiere infizierbar sind, könnte in diesen Tieren die Effektivität einer Immunisierung mit p15E von PERV getestet werden. Erste Hinweise auf die Effektivität einer Immunisierung mit der rekombinant generierten Ektodomäne des TM-Proteins der Gammaretroviren sind auch schon von einem derzeit anlaufenden *in vivo*-Infektionsversuch mit Katzen und FeLV zu erwarten.

Sollten sich in diesen Versuchen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten bestätigen, ist davon auszugehen, dass eine präventive Immunisierung zukünftiger Transplantatempfänger durch rp15E möglich ist.

Derzeit gibt keine weiteren Hinweise auf eine Übertragung von PERV auf den Menschen. Auch die Xenotransplantation kann noch nicht im großen Umfang in die klinische Praxis eingeführt werden. Trotz vieler kleiner und großer Fortschritte wird die Lösung gravierender physiologischer, anatomischer und immunologischer Probleme noch mehrere Jahre oder sogar Jahrzehnte in Anspruch nehmen. Eine Einführung eines PERV-Impfstoffes in die klinischen Phasen scheint daher zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht sinnvoll. Die erfolgreichen *in vivo*-Versuche im Maus- und Katzenmodell vorausgesetzt, kann dieses Projekt somit als abgeschlossen betrachtet werden.

Die Aufklärung des Bindungsmechanismus von 2F5 könnte die Basis für neue Impfstoffansätze sein. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Analyse des

monoklonalen Antikörpers 4E10. Da das Epitop dieses ebenfalls breitneutralisierenden Antikörpers in direkter Nachbarschaft zum 2F5-Epitop lokalisiert ist, könnte die Analyse die hier gesammelten Daten bestätigen oder sogar noch weitere Erkenntnisse zum Neutralisationsmechanismus oder zur „korrekten“ Konformation des membranproximalen E2-Bereiches betragen.

Obwohl gezeigt werden konnte, dass die Induktion HIV-neutralisierender Antikörper durch den gewählten Ansatz generell möglich ist, sind die Ergebnisse der Immunisierungsstudien unbefriedigend. Wie unter 4.3. bereits diskutiert, könnte ein Grund dafür in dem für die Versuche nur bedingt geeigneten Rattenmodell liegen. Die Wiederholung der Versuche im Kaninchenmodell ist bereits angelaufen.

Eingehende Strukturuntersuchungen zur Interaktion der identifizierten E1-Sequenz mit dem 2F5-Epitop durch spektroskopische Methoden sind notwendig. Die Kenntnis über die genaue Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der beiden Peptide während der Bildung eines neutralisierenden Epitopes, könnte beim Design eines effektiven Antigens von entscheidender Bedeutung sein.

Ziel der unmittelbar bevorstehenden Arbeiten muss die Reproduktion der bisherigen Ergebnisse sowie die Optimierung des Antigens sein. Ein effektiver HIV-Impfstoff muss neutralisierende Antikörper gegen Primärisolate verschiedener Subtypen induzieren. In den weiteren Versuchen muss untersucht werden, ob durch den hier gewählten Ansatz solche Antikörper induziert werden können.

V Zusammenfassung

Die Entwicklung effektiver Impfstoffe gegen die Erreger alter und neuer Infektionskrankheiten, wie HIV, Malaria, Tuberkulose und SARS, ist eine der größten Herausforderungen an die moderne Wissenschaft. Ziel dieser Arbeit war es, neutralisierende Antikörper gegen die transmembranen Hüllproteine (TM-Proteine) von Retroviren zu induzieren. Die TM-Proteine wurden gewählt, weil sie eine wichtige Rolle bei der Infektion spielen und im Unterschied zu den Oberflächenhüllproteinen deutlich stärker konserviert sind. Die Untersuchungen wurden am TM-Protein des endogenen Gammaretrovirus PERV und des humanen Immundefizienzvirus HIV durchgeführt.

Obwohl derzeit keine *in vivo*-Übertragung von PERVs auf den Menschen beschrieben ist, zeigen Untersuchungen, dass PERVs *in vitro* an humane Zellen adaptieren und diese produktiv infizieren können. Damit stellen PERVs ein potentiell Risiko im Rahmen der Xenotransplantation dar.

Durch die Immunisierung mit der rekombinant generierten Ektodomäne des TM-Proteins p15E von PERV konnte in allen Versuchstieren zweier Spezies (Ratten, Ziegen) neutralisierende Antikörper induziert werden. Die Epitopkartierung zeigt eine Bindung der Antikörper an Domänen im N-terminalen und C-terminalen Bereich der p15E-Ektodomäne. Die Ergebnisse der Experimente weisen auf die Bildung eines Konformationsepitops durch beide Domänen hin. Auf der Grundlage dieser Daten wurde ein Modell für den Mechanismus der Bindung und der Neutralisation erarbeitet. Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass die präventive Immunisierung zukünftiger Transplantatempfänger eine mögliche Strategie zur Verhinderung einer möglichen Übertragung von PERVs darstellt.

Die aus HIV-Infizierten isolierten, breit neutralisierenden monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10 binden an eine Domäne im C-terminalen Bereich der Ektodomäne des TM-Proteins gp41 von HIV, die ähnlich lokalisiert ist wie die bei PERV. Die Induktion 2F5-ähnlicher Antikörper ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht gelungen. Mittels Bindungsstudien und Hemmung der Neutralisation durch entsprechende synthetische Peptide wurde im N-terminalen Bereich von gp41 eine Domäne identifiziert, die an der hochaffinen Bindung von 2F5 entscheidend beteiligt ist. Diese Domäne ist ähnlich lokalisiert wie die bei PERV.

Auf Basis dieser neuen Erkenntnisse wurden Immunisierungsstudien in Ratten durchgeführt. Zur Immunisierung wurden rekombinant hergestellte, beide Domänen von gp41- enthaltende Proteine, sowie synthetische Peptide, die von dem 2F5 Epitop und der neu identifizierten N-terminalen bindungsunterstützenden Domäne abgeleitet wurden, eingesetzt. Die

Immunisierung mit rekombinanten gp41-Proteinen führte nicht zur Induktion neutralisierender Seren, jedoch konnten in zwei Fällen HIV-1-neutralisierende Antikörper durch Immunisierung mit entsprechenden synthetischen Peptiden induziert werden. Kontrollversuche bestätigen die HIV-Spezifität dieser neutralisierenden Seren.

Diese Ergebnisse zeigen das hohe Potential des gewählten Ansatzes, der nun in weiteren Versuchen optimiert werden muss.

Literaturverzeichnis

- Baltimore D, Huang AS, Stampfer M.** Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus, II. An RNA polymerase in the virion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1970 *Jun*;66(2):572-6
- Barbato G, Bianchi E, Ingallinella P, Hurni WH, Miller MD, Ciliberto G, Cortese R, Bazzo R, Shiver JW, Pessi A.** Structural analysis of the epitope of the anti-HIV antibody 2F5 sheds light into its mechanism of neutralization and HIV fusion. *J Mol Biol*. 2003 *Jul* 25;330(5):1101-15.
- Böcher M, Giersch T, Schmid RD.** Dextran, a hapten carrier in immunoassays for s-triazines. A comparison with ELISAs based on hapten-protein conjugates. *J Immunol Methods*. 1992 *Jul* 6;151(1-2):1-8.
- Bradford M.** Analytische Biochemie , 1976, S.72, 248
- Breese SS Jr** Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines. Brief report. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1970;30(4):401-4.
- Burton DR, Pyati J, Koduri R, Sharp SJ, Thornton GB, Parren PW, Sawyer LS, Hendry RM, Dunlop N, Nara PL, et al.** Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science*. 1994 *Nov* 11;266(5187):1024-7.
- Calarese DA, Scanlan CN, Zwick MB, Deechongkit S, Mimura Y, Kunert R, Zhu P, Wormald MR, Stanfield RL, Roux KH, Kelly JW, Rudd PM, Dwek RA, Katinger H, Burton DR, Wilson IA** Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science*. 2003 *Jun* 27;300(5628):2065-7
- Calarota S, Jansson M, Levi M, Broliden K, Libonatti O, Wigzell H, Wahren B.** Immunodominant glycoprotein 41 epitope identified by seroreactivity in HIV type 1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996 *May* 20;12(8):705-13.
- Cassol S, Salas T, Lapointe N, Arella M, Rudnik J, O'Shaughnessy M.** Improved detection of HIV-1 envelope sequences using optimized PCR and inosine-substituted primers. *Mol Cell Probes*. 1991 *Apr*;5(2):157-60.
- Cleveland SM, McLain L, Cheung L, Jones TD, Hollier M, Dimmock NJ.** A region of the C-terminal tail of the gp41 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus

- type 1 contains a neutralizing epitope: evidence for its exposure on the surface of the virion. *J Gen Virol.* 2003 *Mar*;84(Pt 3):591-602.
- Coeffier E, Clement JM, Cussac V, Khodaei-Boorane N, Jehanno M, Rojas M, Dridi A, Latour M, El Habib R, Barre-Sinoussi F, Hofnung M, Leclerc C.** Antigenicity and immunogenicity of the HIV-1 gp41 epitope ELDKWA inserted into permissive sites of the MalE protein. *Vaccine.* 2000 *Nov 22*;19(7-8):684-93.
- Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE.** Retroviruses Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1 edition, 1997
- Cohen SN, Chang AC, Hsu L.** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972 *Aug*;69(8):2110-4.
- Cozzi E, White DJ** The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat Med.* 1995 *Sep*;1(9):964-6.
- Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA, Ayares DL.** Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol.* 2002 *Mar*;20(3):251-5.
- Darnell J, Lodish H, Baltimore D.** Molekulare Zellbiologie, 1.Aufl. Walter de Gruyter Verlag, 1994, S. 1142
- Denner J, Norley S, Kurth R.** The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients. *AIDS.* 1994 *Aug*;8(8):1063-72.
- Denner J, Persin C, Vogel T, Haustein D, Norley S, Kurth R** The immunosuppressive peptide of HIV-1 inhibits T and B lymphocyte stimulation. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1996 *Aug 15*;12(5):442-50.
- Denner J, Specke V, Schwendemann J, Tacke SJ** Porcine endogenous retroviruses (PERVs): adaptation to human cells and attempts to infect small animals and non-human primates. *Ann Transplant.* 2001;6(3):25-33.
- Denner J.** How does HIV induce AIDS? The virus protein hypothesis. *J Hum Virol.* 2000 *Mar-Apr*;3(2):81-2.
- Denner J.** Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 *Dec 30*;862:75-86

- Denner J.** Porcine endogenous retroviruses (PERVs) and xenotransplantation: screening for transmission in several clinical trials and in experimental models using non-human primates. *Ann Transplant.* 2003;8(3):39-48
- Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K.** Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med.* 2002 Dec 16;196(12):1645-51.
- Elder JH, McGee JS, Munson M, Houghten RA, Kloetzer W, Bittle JL, Grant CK.** Localization of neutralizing regions of the envelope gene of feline leukemia virus by using anti-synthetic peptide antibodies. *J Virol.* 1987 Jan;61(1):8-15
- Ernst W, Grabherr R, Wegner D, Borth N, Grassauer A, Katinger H.** Baculovirus surface display: construction and screening of a eukaryotic epitope library. *Nucleic Acids Res.* 1998 Apr 1;26(7):1718-23.
- Evans DT, Desrosiers RC.** Immune evasion strategies of the primate lentiviruses. *Immunol Rev.* 2001 Oct;183:141-58.
- Fiebig U, Stephan O, Kurth R, Denner J.** Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses: basis for a vaccine for xenotransplantation? *Virology.* 2003 Mar 15;307(2):406-13.
- Freedberg KA, Losina E, Weinstein MC, Paltiel AD, Cohen CJ, Seage GR, Craven DE, Zhang H, Kimmel AD, Goldie SJ.** The cost effectiveness of combination antiretroviral therapy for HIV disease. *N Engl J Med.* 2001 Mar 15;344(11):824-31
- Galili U.** Evolution and pathophysiology of the human natural anti-alpha-galactosyl IgG (anti-Gal) antibody. *Springer Semin Immunopathol.* 1993;15(2-3):155-71.
- Gallo RC, Montagnier L** The discovery of HIV as the cause of AIDS. *N Engl J Med.* 2003 Dec 11;349(24):2283-5
- Gallo RC, Poiesz BJ, Ruscetti FW.** Regulation of human T-cell proliferation: T-cell growth factor and isolation of a new class of type-C retroviruses from human T-cells *Haematol Blood Transfus.* 1981;26:502-14
- Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, Novitsky V, Haynes B, Hahn BH, Bhattacharya T, Korber B.** Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science.* 2002 Jun 28;296(5577):2354-60.

- Gauduin MC, Parren PW, Weir R, Barbas CF, Burton DR, Koup RA.** Passive immunization with a human monoclonal antibody protects hu-PBL-SCID mice against challenge by primary isolates of HIV-1. *Nat Med.* 1997 *Dec*;3(12):1389-93.
- Geffin RB, Scott GB, Melenwick M, Hutto C, Lai S, Boots LJ, McKenna PM, Kessler JA 2nd, Conley AJ.** Association of antibody reactivity to ELDKWA, a glycoprotein 41 neutralization epitope, with disease progression in children perinatally infected with HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1998 *May 1*;14(7):579-90.
- Golding H, Zaitseva M, de Rosny E, King LR, Manischewitz J, Sidorov I, Gorny MK, Zolla-Pazner S, Dimitrov DS, Weiss CD.** Dissection of human immunodeficiency virus type 1 entry with neutralizing antibodies to gp41 fusion intermediates. *J Virol.* 2002 *Jul*;76(13):6780-90.
- Heneine W, Tibell A, Switzer WM, Sandstrom P, Rosales GV, Mathews A, Korsgren O, Chapman LE, Folks TM, Groth CG.** No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet.* 1998 *Aug 29*;352(9129):695-9.
- Hermanson GT; Mallia AK, Smith PK.** in "Immobilized Affinity Ligand Techniques." Academic Press, San Diego. 1992.
- Irgang M, Sauer IM, Karlas A, Zeilinger K, Gerlach JC, Kurth R, Neuhaus P, Denner J.** Porcine endogenous retroviruses: no infection in patients treated with a bioreactor based on porcine liver cells. *J Clin Virol.* 2003 *Oct*;28(2):141-54.
- James JS.** T-20: most expensive AIDS drug ever at \$25,000 per year? *AIDS Treat News.* 2003 *Mar 14*;(389):6-7.
- Janeway, A.C, P. Travers, M. Walport., J.M. Shlomchik.** Immunology New York, NY: Elsevier Science Ltd., 2001
- Joyce JG, Hurni WM, Bogusky MJ, Garsky VM, Liang X, Citron MP, Danzeisen RC, Miller MD, Shiver JW, Keller PM.** Enhancement of alpha -helicity in the HIV-1 inhibitory peptide DP178 leads to an increased affinity for human monoclonal antibody 2F5 but does not elicit neutralizing responses in vitro. Implications for vaccine design. *J Biol Chem.* 2002 *Nov 29*;277(48):45811-20. Epub 2002 Sep 16.
- Kageyama S, Katsumoto T, Taniguchi K, Ismail SI, Shimmen T, Sasao F, Gao M, Owatari S, Wakamiya N, Tsuchie H, Ueda S, Shiraki K, Kurimura T.**

- Neutralization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) with antibody from carriers' plasma against HIV-1 protein p17. *Acta Virol.* 1996 *Sep*;40(4):195-200.
- Kitabwalla M, Ferrantelli F, Wang T, Chalmers A, Katinger H, Stiegler G, Cavacini LA, Chou TC, Ruprecht RM.** Primary African HIV clade A and D isolates: effective cross-clade neutralization with a quadruple combination of human monoclonal antibodies raised against clade B. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2003 *Feb*;19(2):125-31.
- Klasse PJ, Sattentau QJ.** Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. *J Gen Virol.* 2002 *Sep*;83(Pt 9):2091-108
- Kleiser C, Schneider J, Bayer H, Hunsmann G.** Immunoprevention of Friend leukaemia virus-induced erythroleukaemia by vaccination with aggregated gp70. *J Gen Virol.* 1986 *Sep*;67 (Pt 9):1901-7.
- Kroshus TJ, Rollins SA, Dalmaso AP, Elliott EA, Matis LA, Squinto SP, Bolman RM 3rd.** Complement inhibition with an anti-C5 monoclonal antibody prevents acute cardiac tissue injury in an ex vivo model of pig-to-human xenotransplantation. *Transplantation.* 1995 *Dec 15*;60(11):1194-202.
- Kunert R, Ruker F, Katinger H.** Molecular characterization of five neutralizing anti-HIV type 1 antibodies: identification of nonconventional D segments in the human monoclonal antibodies 2G12 and 2F5. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1998 *Sep 1*;14(13):1115-28.
- Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 *Aug 15*;227(5259):680-5.
- Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS.** Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science.* 2002 *Feb 8*;295(5557):1089-92. Epub 2002 Jan 03.
- Langhammer S., Fiebig U., Kurth R., Denner J.** Neutralising antibodies against the transmembrane protein of feline leukemia virus (FeLV), *Vaccine.* 2005 *May 9*;23(25):3341-8.
- Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ** Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120)

- expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1990 *Jun* 25;265(18):10373-82
- Lieber MM, Sherr CJ, Todaro GJ, Benveniste RE, Callahan R, Coon HG.** Isolation from the asian mouse *Mus caroli* of an endogenous type C virus related to infectious primate type C viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975 *Jun*;72(6):2315-9.
- Liu S, Zhao Q, Jiang S.** Determination of the HIV-1 gp41 fusogenic core conformation modeled by synthetic peptides: applicable for identification of HIV-1 fusion inhibitors. *Peptides.* 2003 *Sep*;24(9):1303-13.
- Lu Y, Xiao Y, Ding J, Dierich MP, Chen YH.** Multiepitope vaccines intensively increased levels of antibodies recognizing three neutralizing epitopes on human immunodeficiency virus-1 envelope protein. *Scand J Immunol.* 2000 *May*;51(5):497-501.
- Lucchiari N, Azimzadeh A, Wolf P, Regnault V, Cinqualbre J** In vivo and in vitro optimization of depletion of IgM and IgG xenoantibodies by immunoadsorption using cell membrane proteins. *Artif Organs.* 1997 *Apr*;21(4):278-86
- Marti DN, Bjelic S, Lu M, Bosshard HR, Jelesarov I.** Fast folding of the HIV-1 and SIV gp41 six-helix bundles. *J Mol Biol.* 2004 *Feb* 6;336(1):1-8.
- McGaughey GB, Citron M, Danzeisen RC, Freidinger RM, Garsky VM, Hurni WM, Joyce JG, Liang X, Miller M, Shiver J, Bogusky MJ.** HIV-1 vaccine development: constrained peptide immunogens show improved binding to the anti-HIV-1 gp41 MAb. *Biochemistry.* 2003 *Mar* 25;42(11):3214-23.
- Modrow S, Falke D, Truyen U.** *Molekulare Virologie* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg/Berlin, 2003
- Moulard M, Phogat SK, Shu Y, Labrijn AF, Xiao X, Binley JM, Zhang MY, Sidorov IA, Broder CC, Robinson J, Parren PW, Burton DR, Dimitrov DS.** Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120-CD4-CCR5 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 *May* 14;99(10):6913-8. Epub 2002 May 07.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.

- Munoz-Barroso I, Salzwedel K, Hunter E, Blumenthal R.** Role of the membrane-proximal domain in the initial stages of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *J Virol.* 1999 *Jul*;73(7):6089-92.
- Muster T, Steindl F, Purtscher M, Trkola A, Klima A, Himmler G, Ruker F, Katinger H.** A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 1993 *Nov*;67(11):6642-7.
- Nick S, Klags J, Friebel K, Birr C, Hunsmann G, Bayer H.** Virus neutralizing and enhancing epitopes characterized by synthetic oligopeptides derived from the feline leukaemia virus glycoprotein sequence. *J Gen Virol.* 1990 *Jan*;71 (Pt 1):77-83.
- Nyambi PN, Mbah HA, Burda S, Williams C, Gorny MK, Nadas A, Zolla-Pazner S.** Conserved and exposed epitopes on intact, native, primary human immunodeficiency virus type 1 virions of group M. *J Virol.* 2000 *Aug*;74(15):7096-107.
- Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, Chapman LE, Lockey C, Onions D, Otto E.** Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science.* 1999 *Aug 20*;285(5431):1236-41.
- Parry J.** WHO queries culling of civet cats. *BMJ.* 2004 *Jan 17*;328(7432):128
- Patience C, Patton GS, Takeuchi Y, Weiss RA, McClure MO, Rydberg L, Breimer ME.** No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. 1998 *Aug 29*;352(9129):699-701.
- Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA** Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med.* 1997 *Mar*;3(3):282-6.
- Purtscher M, Trkola A, Grassauer A, Schulz PM, Klima A, Dopper S, Gruber G, Buchacher A, Muster T, Katinger H.** Restricted antigenic variability of the epitope recognized by the neutralizing gp41 antibody 2F5. *AIDS.* 1996 *Jun*;10(6):587-93.
- Purtscher M, Trkola A, Gruber G, Buchacher A, Predl R, Steindl F, Tauer C, Berger R, Barrett N, Jungbauer A.** A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994 *Dec*;10(12):1651-8.
- Rizzuto CD, Wyatt R, Hernandez-Ramos N, Sun Y, Kwong PD, Hendrickson WA, Sodroski J** A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science.* 1998 *Jun 19*;280(5371):1949-53

- Rota PA, Rocha EP, Harmon MW, Hinshaw VS, Sheerar MG, Kawaoka Y, Cox NJ, Smith TF** Laboratory characterization of a swine influenza virus isolated from a fatal case of human influenza. *J Clin Microbiol.* 1989 *Jun*;27(6):1413-6.
- Ruprecht RM, Ferrantelli F, Kitabwalla M, Xu W, McClure HM.** Antibody protection: passive immunization of neonates against oral AIDS virus challenge. *Vaccine.* 2003 *Jul 28*;21(24):3370-3.
- Sackett K, Shai Y.** How structure correlates to function for membrane associated HIV-1 gp41 constructs corresponding to the N-terminal half of the ectodomain. *J Mol Biol.* 2003 *Oct 10*;333(1):47-58.
- Salzwedel K, West JT, Hunter E.** A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity. *J Virol.* 1999 *Mar*;73(3):2469-80.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 *Dec*;74(12):5463-7.
- Satake K, Yokomatsu H, Hiura A.** Effects of a new synthetic lipid A on endogenous tumor necrosis factor production and antitumor activity against human pancreatic cancer cells. *Pancreas.* 1996 *Apr*;12(3):260-6.
- Sattentau QJ, Moulard M, Brivet B, Botto F, Guillemot JC, Mondor I, Poignard P, Ugolini S.** Antibody neutralization of HIV-1 and the potential for vaccine design. *Immunol Lett.* 1999 *Mar*;66(1-3):143-9.
- Scanlan CN, Pantophlet R, Wormald MR, Ollmann Saphire E, Stanfield R, Wilson IA, Katinger H, Dwek RA, Rudd PM, Burton DR.** The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. *J Virol.* 2002 *Jul*;76(14):7306-21.
- Schagger H, Aquila H, Von Jagow G.** Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal Biochem.* 1988 *Aug 15*;173(1):201-5
- Scholz C, Eckert B, Hagn F, Schaarschmidt P, Balbach J, Schmid FX.** SlyD proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities. *Biochemistry.* 2006 *Jan 10*;45(1):20-33.

- Scholz C, Schaarschmidt P, Engel AM, Andres H, Schmitt U, Faatz E, Balbach J, Schmid FX.** Functional solubilization of aggregation-prone HIV envelope proteins by covalent fusion with chaperone modules. *J Mol Biol.* 2005 *Feb 4*;345(5):1229-41. Epub 2004 Dec 7.
- Sparkes AH.** Feline leukaemia virus: a review of immunity and vaccination. *J Small Anim Pract.* 1997 *May*;38(5):187-94.
- Specke V, Rubant S, Denner J.** Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses. *Virology.* 2001 *Jul 5*;285(2):177-80.
- Specke V, Schuurman HJ, Plesker R, Coulibaly C, Ozel M, Langford G, Kurth R, Denner J.** Virus safety in xenotransplantation: first exploratory in vivo studies in small laboratory animals and non-human primates. *Transpl Immunol.* 2002 *May*;9(2-4):281-8.
- Stiegler G, Armbruster C, Vcelar B, Stoiber H, Kunert R, Michael NL, Jagodzinski LL, Ammann C, Jager W, Jacobson J, Vetter N, Katinger H.** Antiviral activity of the neutralizing antibodies 2F5 and 2G12 in asymptomatic HIV-1-infected humans: a phase I evaluation. *AIDS.* 2002 *Oct 18*;16(15):2019-25.
- Stiegler G, Kunert R, Purtscher M, Wolbank S, Voglauer R, Steindl F, Katinger H.** A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2001 *Dec 10*;17(18):1757-65.
- Stoscheck CM.** Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology* 182: 50-69, 1990
- Tacke SJ, Specke V, Denner J.** Differences in release and determination of subtype of porcine endogenous retroviruses produced by stimulated normal pig blood cells. *Intervirology.* 2003;46(1):17-24.
- Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG** Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science.* 1997 *Mar 21*;275(5307):1793-6.
- Thali M, Moore JP, Furman C, Charles M, Ho DD, Robinson J, Sodroski J.** Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *J Virol.* 1993 *Jul*;67(7):3978-88.

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 *Sep*;76(9):4350-4.
- Trkola A, Pomales AB, Yuan H, Korber B, Maddon PJ, Allaway GP, Katinger H, Barbas CF 3rd, Burton DR, Ho DD, et al.** Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J Virol*. 1995 *Nov*;69(11):6609-17.
- Ugolini S, Moulard M, Mondor I, Barois N, Demandolx D, Hoxie J, BreLOT A, Alizon M, Davoust J, Sattentau QJ.** HIV-1 gp120 induces an association between CD4 and the chemokine receptor CXCR4. *J Immunol*. 1997 *Sep 15*;159(6):3000-8.
- Walker JM, Gingold EB.** *Molecular Biology and Biotechnology*, 3rd Edition, Royal Society of Chemistry, 1993, S. 41-42
- West CM, Keng PC, Siemann DW, Sutherland RM** A human colon adenocarcinoma xenograft--radiation response, cellular composition, and tumor disaggregation. *J Natl Cancer Inst*. 1987 *Feb*;78(2):371-6.
- Wieggers K, Rutter G, Kottler H, Tessmer U, Hohenberg H, Krausslich HG** Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *J Virol*. 1998 *Apr*;72(4):2846-54.
- Wild C, Greenwell T, Shugars D, Rimsky-Clarke L, Matthews T.** The inhibitory activity of an HIV type 1 peptide correlates with its ability to interact with a leucine zipper structure. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1995 *Mar*;11(3):323-5.
- Wolbank S, Kunert R, Stiegler G, Katinger H.** Characterization of human class-switched polymeric (immunoglobulin M [IgM] and IgA) anti-human immunodeficiency virus type 1 antibodies 2F5 and 2G12. *J Virol*. 2003 *Apr*;77(7):4095-103
- Wu TT, Johnson G, Kabat EA.** Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins*. 1993 *May*;16(1):1-7.
- Yamada K, Sachs DH, DerSimonian H** Human anti-porcine xenogeneic T cell response. Evidence for allelic specificity of mixed leukocyte reaction and for both direct and indirect pathways of recognition. *J Immunol*. 1995 *Dec 1*;155(11):5249-56
- Young DB** *The Vaccine Book*, Elsevier Science, 2003

Youngren SD, Vukasin AP, de Noronha F. Characterization of monoclonal antibodies directed against the envelope proteins of feline leukemia virus. *Cancer Res.* 1984 *Aug*;44(8):3512-7.

Zara JJ, Wood RD, Boon P, Kim CH, Pomato N, Bredehorst R, Vogel CW. A carbohydrate-directed heterobifunctional cross-linking reagent for the synthesis of immunoconjugates. *Anal Biochem.* 1991 *Apr*;194(1):156-62.

Zwick MB, Komori HK, Stanfield RL, Church S, Wang M, Parren PW, Kunert R, Katinger H, Wilson IA, Burton DR. The long third complementarity-determining region of the heavy chain is important in the activity of the broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5. *J Virol.* 2004 *Mar*;78(6):3155-61.

Zwick MB, Labrijn AF, Wang M, Spenlehauer C, Saphire EO, Binley JM, Moore JP, Stiegler G, Katinger H, Burton DR, Parren PW. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol.* 2001 *Nov*;75(22):10892-905.

Eigene Publikationen

Paper:

Fiebig, U., Stephan, O., Kurth, R., Denner, J.

Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses (PERVs): Basis for a vaccine for xenotransplantation?

Virology 307 (2), 406-413 (2003)

Langhammer, S., Fiebig, U., Kurth, R., Denner, J. Neutralising antibodies against the transmembrane protein of feline leukaemia virus (FeLV). *Vaccine* 23, 3341-3348 (2005).

Fiebig, U., Hartmann, M. G., Bannert, N., Kurth R., Denner J. Transspecies transmission of the endogenous koala retrovirus (KoRV) *J Virol.* 2006 *Jun*;80(11):5651-4

Patentanmeldung:

Fiebig, U., Schmolke, M., Karlas A., Kurth, R., Denner, J. Induction of anti-viral neutralising antibodies in humans and animals. World Intellectual Property Organisation patent 2005; WO 2005/021574.

Langhammer, S., Fiebig, U., Denner, J., Kurth, R. Pharmaceutical composition and its use for the prophylactic or therapeutic treatment of retroviral diseases EP patent application 05 090 247.7-2403 filed on August 26, 2005

Poster und Vorträge:

Denner, J., Specke, V., Ulrichs, K., Tacke, S., Plesker, R., Coulibaly C., Langford, G., Schuurmann, H., Bühler, C., Meyer, T., Breuer, S., Patience, C., **Fiebig, U.**, Karlas A., Irgang, M. Porcine endogene Retroviren (PERVs) und Xenotransplantation: Biologische Eigenschaften und Tiermodelle
5. Symposium für innovativen Organersatz, Schloss Rauischholzhausen (2001)

Fiebig, U., Stephan, O., Denner, J. Neutralisierende Antikörper gegen Epitope innerhalb der Ektodomäne des transmembranalen Hüllproteins p15E der porcinen endogenen Retroviren (PERVs) – Indikation für die Immunsierung zukünftiger

Transplantatrezipienten im Rahmen der Xenotransplantation?

5. Symposium für innovativen Organersatz, Schloss Rauischholzhausen (2001)

Fiebig, U., Kurth, R., Denner, J. Induction of Neutralizing Antibodies Against Conserved Domains of p15E of Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs): Basis for a Vaccine for Xenotransplantation?

Jahrestagung, Gesellschaft für Virologie, Erlangen, 179 (2002)

Denner, J., Grashoff, C., Rademacher, N., Schmolke, M., **Fiebig, U.**, Kurth, R. Comparison of the immunosuppressive properties of HIV and other retroviruses

Int. Meeting Institute of the Institute of Human Virology, Baltimore (2002)

Fiebig, U., Eden, B., Kurth, R., Denner, J. Reproducible generation of neutralising antibodies against porcine endogenous retroviruses (PERVs) using the transmembrane envelope protein p15E as antigen Jahrestagung Gesellschaft für Virologie, Berlin, 270, (2003)

Denner J. , Karlas, A., **Fiebig, U.**, Kurth, R. Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs): Strategies to Prevent Transmission Following Xenotransplantation

Seventh International Xenotransplantation Congress 2003, Glasgow (2003)

Denner, J., Karlas, A., **Fiebig, U.** Strategien zur Verhinderung der Übertragung porciner endogener Retroviren (PERVs) bei der Xenotransplantation 3. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft Kiel, Deutschland, (2004)

Fiebig, U., Schmolke, M., Kurth, R., Denner, J. Induction of neutralising antibodies against retroviruses by immunisation with recombinant transmembrane proteins Annual Meeting of the “Gesellschaft für Virologie” Hannover, IVI 25, 58 (2005)

Langhammer, S., **Fiebig, U.**, Kurth, R., Denner, J. Neutralising antibodies against the transmembrane protein of feline leukaemia virus (FeLV) Annual Meeting of the “Gesellschaft für Virologie” Hannover, RET 28, 113 (2005)

Fiebig, U., Scholz, C., Schaarschmidt, P., Klein, S., Kurth, R., Denner, J. Failure to induce neutralising antibodies using soluble chaperone fusion proteins of the transmembrane envelope protein gp41 of HIV-1 Annual Meeting of the “Gesellschaft für Virologie” Hannover, VAT 22, 490 (2005)

- Fiebig, U.**, Langhammer, S., Schmolke, M., Klein, S., Kurth, R., Denner, J Attempts to induce HIV neutralising antibodies using gp41-derived constructs containing ELDKWA. Deutsch-Österreichischer AIDS-Kongress, Wien (2005). European J. Med. Res., 10 (2), P 107, 67-68 (2005)
- Fiebig, U.**, Langhammer, S., Kurth, R., Denner, J. Induction of HIV-neutralising antibodies of the 2F5/4E10 type International Meeting of the Institute of Human Virology, Baltimore, A71, (2005)
- Fiebig, U.**, Langhammer, S., Büscher, K., Kluge, B., Behrendt R, Kurth, R., Denner, J. Immunopathogenesis by HIV and other Retroviruses; Neutralising Antibodies as Basis for Vaccines against HIV and other Retroviruses ZIBI Forschungswochenende, Teikyo University, Zeuthen, Berlin, (2005)
- Denner, J., Karlas, A., **Fiebig, U.**, Kluge, B., Pfeifer, A., Niemann, H., Kurth, R. Development of Strategies to Prevent Transmission of Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs) Following Xenotransplantation 8th Congress of the International Xenotransplantation Association, Glasgow, O8:2, (2005)
- Fiebig, U.**, Langhammer, S., Kurth, R., Denner, J. Induction of HIV-neutralising antibodies of the 2F5/4E10 type and of similar antibodies neutralising other retroviruses. New Approaches to Vaccine Development-from the bench to the field, Berlin, (2005)
- Kluge, B., Karlas, A., **Fiebig, U.**, Pfeifer, A., Kurth, R., Niemann, H., Denner, J. Weiterentwicklung von Strategien zur Verhinderung der Übertragung porciner endogener Retroviren (PERVs) bei der Xenotransplantation. 14. Jahrestagung Deutsche Transplantationsgesellschaft, 108-9, (2005)
- Fiebig, U.**, Langhammer, S., Kurth, R., Denner, J. Induction of HIV-neutralising Antibodies of the 2F5/4E10 Type 2005 International Meeting of The Institute of Human Virology, Baltimore, USA, (2005) Retrovirology, 2(Suppl I), S71 (2005)
- Fiebig, U.**, Schmolke, M., Kurth, R., Denner, J. Induction of neutralising antibodies against HIV by immunisation with hybrid proteins composed of p15E of PERV and two domains of gp41 of HIV Annual Meeting of the “Gesellschaft für Virologie” München, 399 (2006)
- Fiebig, U.**, Garcia Hartmann, M., Bannert, N., Kurth, R., Denner, J. Koala retrovirus (KoRV): properties and transspecies transmission in vitro and in vivo Annual Meeting of the “Gesellschaft für Virologie” München, 142 (2006)

Eidesstattliche Erklärung von Uwe Fiebig

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, April 2007

Uwe Fiebig